

Untersuchungen zum Humanmetabolismus des Bismuts mittels massenspektrometrischer Kopplungstechniken

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen**

**von
Jens Boertz
geboren in Herten/Westfalen**

Essen, August 2008

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr. T. Schrader

1. Gutachter:

Prof. Dr. A.V. Hirner

2. Gutachter:

Prof. Dr. A.W. Rettenmeier

Tag der Abgabe: 25.08.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2008

Ich kann, weil ich will, was ich muss.

(Immanuel Kant)

Inhaltsübersicht

Inhaltsübersicht	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	1
2 Thematische Grundlagen	2
3 Instrumenteller Teil.....	35
4 Experimenteller Teil.....	46
5 Auswertung und Ergebnisse	64
6 Diskussion	91
7 Zusammenfassung.....	106
8 Summary	108
9 Ausblick.....	110
10 Literatur	111
11 Anhang	129
Lebenslauf	163
Publikationsliste.....	165
Vorträge und Posterbeiträge	166
Erklärungen	168
Danksagung.....	169

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsübersicht	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung	1
2 Thematische Grundlagen	2
2.1 Bismut.....	2
2.2 Bismut in der Medizin.....	3
2.2.1 Bismut als antimikrobieller/entzündungshemmender Wirkstoff	3
2.2.2 Bismut in der Krebstherapie.....	4
2.2.3 Kolloidales Bismutsubcitrat	5
2.2.4 Pharmakokinetik und Toxizität von Bismut-Verbindungen	6
2.2.4.1 Verteilung von Bismut in Geweben.....	7
2.2.4.2 Humantoxizität	9
2.3 Biomethylierung von Elementen.....	10
2.3.1 Biomethylierung und molekulare Eigenschaften	11
2.3.2 Mechanismen der Biomethylierung	12
2.3.2.1 Challenger-Mechanismus	13
2.3.2.2 Methylcobalamin als Methyl donor.....	17
2.3.3 Biomethylierung von Bismut	19
2.4 Methoden zur Bismut-Analytik	20
2.4.1 Gaschromatographie.....	20
2.4.1.1 Kenngrößen der Chromatographie.....	20
2.4.1.2 Chromatographische Auflösung	21
2.4.1.3 Die van Deemter-Funktion	22
2.4.1.4 Beeinflussung der Auflösung.....	24
2.4.1.5 Einstellung des Trägergasflusses	24
2.4.2 Massenspektrometrie.....	25
2.4.2.1 Ionenquelle und Ionisation.....	26
2.4.2.2 Das Einlasssystem	27
2.4.2.3 Trennsysteme in der Massenspektrometrie.....	29
2.4.2.4 Die Detektionseinheit	30

2.4.3	Kopplungstechniken zur Elementspezifizierung	32
2.4.4	Interelement-Interaggregat-Kalibrierung	33
3	Instrumenteller Teil.....	35
3.1	Gase, Chemikalien und Laborzubehör	35
3.2	Analysengeräte	40
3.2.1	GC/MS	40
3.2.2	ICP-MS.....	41
3.2.3	LT-GC/ICP-MS.....	41
3.2.4	GC/EI-MS/ICP-MS	43
3.2.5	ADVIA® Chemistry System.....	45
3.3	Auswertungssoftware.....	45
4	Experimenteller Teil.....	46
4.1	Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora.....	46
4.1.1	Motivation und Zielsetzung	46
4.1.2	Studienteilnehmer und Studiendesign	47
4.1.3	Probenahme und Analytik	48
4.2	Kinetik eines Probanden mit größerer Zeitauflösung nach Ingestion von Bismutsubcitrat	48
4.2.1	Motivation und Zielsetzung	48
4.2.2	Studienteilnehmer und Studiendesign	49
4.2.3	Probennahme und Analytik.....	50
4.3	Untersuchungen an humanen Hepatozyten zur Bismut-Methylierung	50
4.3.1	Motivation und Zielsetzung	50
4.3.2	Auftauen humaner Hepatozyten.....	51
4.3.3	Kultivierung/Passage humaner Hepatozyten.....	52
4.3.4	Zählung humaner Hepatozyten	52
4.3.5	Synthese von kolloidalem Bismutsubcitrat (CBS).....	53
4.3.6	Synthese von Bismutglutathion (GSH) ₂ Bi.....	53
4.3.7	Synthese von Bismutcystein (Cys) ₂ Bi.....	54
4.3.8	Inkubation von HepG2-Zellen mit Bismutsubcitrat, Bismutglutathion und Bismutcystein	54
4.4	Analytische Methoden.....	54
4.4.1	Gesamtmetallanalytik in Blut-, Urin- und Fäzesproben.....	54

4.4.2	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	55
4.4.3	Befüllung sowie Konditionierung der Kühlfallen und der gepackten Chromatographiesäule.....	56
4.4.4	Retentionszeitbestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ <i>via</i> LT-GC/ICP-MS	56
4.4.5	Bestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Atemluftproben	56
4.4.6	Bestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Blutproben.....	57
4.4.7	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben <i>via</i> LT-GC/ICP-MS	57
4.4.8	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben <i>via</i> GC/MS.....	57
4.4.9	Bestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben	58
4.4.10	Speziesanalytik in Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Regenzien <i>via</i> LT-GC/ICP-MS	59
4.4.11	Speziesanalytik in Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien und anschließender Ethylierung mittels Natriumtetraethylborat <i>via</i> GC/EI-MS/ICP-MS	59
4.4.12	Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ mittels LT-GC/ICP-MS.....	61
4.4.13	Kreatininbestimmung	61
4.5	Qualitätssicherung	61
4.5.1	Bestimmung und Einstellung der Helium-Volumenströme	61
4.5.2	Subboiling-Aufreinigung von HNO_3	62
4.5.3	Reinigung der PFA-Gefäße und Messkolben für die Ultraspurenanalytik	62
4.5.4	Blindwerte, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	62
4.5.5	Homogenisierung und Repräsentativität der Stuhlproben	62
4.5.6	Gesamtmetallanalytik.....	63
4.5.7	Speziesanalytik von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	63
4.5.8	Probennahme und Probenlagerung.....	63
5	Auswertung und Ergebnisse	64
5.1	Analytische Methoden.....	64
5.1.1	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ <i>via</i> GC/EI-MS/ICP-MS.....	64
5.1.2	Bestimmung der Retentionszeit von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	64
5.2	Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora.....	65
5.2.1	Bismut-Konzentrationen in Blutproben nach der Bismutgabe	65
5.2.2	Bismut-Konzentrationen in Urinproben und renale Eliminierung nach der Bismutgabe.....	66

5.2.3	Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben nach der Bismutgabe	68
5.2.4	Nachweis von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Atemluft- und Blutproben nach der Bismutgabe	68
5.2.5	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben nach der Bismutgabe	68
5.2.6	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben nach der Bismutgabe	69
5.2.7	Gegenüberstellung der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft.....	70
5.3	Kinetik eines Probanden mit größerer Zeitauflösung nach Ingestion von Bismutsubcitrat	71
5.3.1	Bismut-Konzentrationen in Blutproben eines Probanden nach der Bismutgabe	72
5.3.2	Bismut-Konzentrationen im Urin und renale Bismut-Eliminierung nach der Bismutgabe.....	72
5.3.3	Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben und fäkale Bismut-Eliminierung nach der Bismutgabe.....	75
5.3.4	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben nach der Bismutgabe	77
5.3.5	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben nach der Bismutgabe	80
5.3.6	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach der Bismutgabe	81
5.4	Untersuchungen an humanen Hepatozyten zur Bismut-Methylierung	86
5.4.1	Speziesanalytik von Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Regenzien <i>via</i> LT-GC/ICP-MS	86
5.4.2	Speziesanalytik von Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien und anschließender Ethylierung mittels Natriumtetraethylborat <i>via</i> GC/EI-MS/ICP-MS	86
6	Diskussion	91
6.1	Analytische Methoden.....	91
6.1.1	Gesamtmetallbestimmung in Blut-, Urin und Fäzesproben	91
6.1.2	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ <i>via</i> GC/EI-MS/ICP-MS.....	91
6.1.3	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ <i>via</i> LT-GC/ICP-MS	92
6.1.4	Identifizierung weiterer flüchtiger Bismutspezies	92
6.1.5	Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ <i>via</i> LT-GC/ICP-MS und IIK	93
6.1.6	Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben <i>via</i> GC/MS und LT-GC/ICP-MS	93
6.1.7	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des ICP-MS und des GC/ICP-MS	93
6.1.8	Ethylierung des Zelllysats mit Natriumtetraethylborat	94
6.2	Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora.....	94

6.2.1	Disposition und Eliminierung des Gesamtbismuts	94
6.2.2	Identifizierung und Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	95
6.2.3	Kinetik von $\text{Bi}(\text{CH}_3)_3$	96
6.3	Kinetik eines Probanden mit größerer Zeitauflösung nach Ingestion von Bismutsubcitrat	96
6.3.1	Disposition und Eliminierung des Gesamtbismuts	96
6.3.2	Identifizierung und Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	97
6.3.3	Kinetik von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$	98
6.4	Massenbilanzen der Bismutstudien	100
6.5	Auswirkungen des veränderten Studiendesigns auf die Bestimmung von Bismut- und $\text{Bi}(\text{CH}_3)_3$-Konzentrationen in humanen Matrices.....	101
6.6	Untersuchungen humaner Hepatozyten zur Bismut-Methylierung.....	102
6.7	Ursprung des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$.....	103
6.8	Toxikologische Folgen der Bismut-Volatilisierung	104
7	Zusammenfassung.....	106
8	Summary	108
9	Ausblick.....	110
10	Literatur.....	111
11	Anhang	129
11.1	Umfang des Laborscreenings vor Studienbeginn.....	129
11.2	Die Basisdaten der Probanden	129
11.3	Das Probenahmeprotokoll der Probandenstudie	130
11.4	Messergebnisse der Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora	131
11.5	Messergebnisse der kinetischen Untersuchung eines Probanden.....	149
11.6	Messergebnisse der Untersuchungen humaner Hepatozyten	159
Lebenslauf		163
Publikationsliste.....		165
Vorträge und Posterbeiträge		166
Erklärungen		168
Danksagung.....		169

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Radioaktives Zerfallsschema des ^{212}Bi und ^{213}Bi	4
Abbildung 2-2: Strukturformel von S-Adenosylmethionin	13
Abbildung 2-3: Generell akzeptierter Weg der Biotransformation anorganischen Arsens	14
Abbildung 2-4: Alternativer Weg der Biotransformation anorganischen Arsens	17
Abbildung 2-5: Strukturformel von Methylcobalamin	18
Abbildung 2-6: Kenngrößen eines Chromatogramms	21
Abbildung 2-7: Beiträge der Eddy-Diffusion, der Longitudinaldiffusion und der Stoffaustauschverzögerung zum Kurvenverlauf der van Deemter-Funktion	23
Abbildung 2-8: Van Deemter-Kurven für Stickstoff, Helium und Wasserstoff als Trägergas	25
Abbildung 2-9: Prinzip (A) und Aufbau (B) der Elektronenstoßionisation	26
Abbildung 2-10: Interface bei einem ICP-MS	28
Abbildung 2-11: Schema eines Quadrupolmassenfilters mit stabilen und instabilen Ionenbahnen	30
Abbildung 2-12: SEV mit diskreten Dynoden (A) und CEM mit kontinuierlicher Dynode (B)	31
Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau der gaschromatographischen Purge&Trap-Einheit und des Schaltkreises der Widerstandsheizdrähte.....	42
Abbildung 3-2: Schematischer Aufbau der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung	43
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Transferleitung vom GC-MS zum ICP-MS (43	
Abbildung 4-1: Lichtmikroskopische Aufnahme von HepG2-Zellen	52
Abbildung 4-2: Darstellung der mäanderförmigen Auszählung von Hepatozyten an einem Neubauer-Zählgitter	53
Abbildung 5-1: Massenspektrum des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standards und Bibliotheksspektrums vom untersuchten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (head to tail).. ..	64
Abbildung 5-2: Vergleich der Retentionszeiten einer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -haltigen Probe und dem $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standard.....	65
Abbildung 5-3: Profile der Gesamtbismut-Konzentrationen der Studienteilnehmer	66
Abbildung 5-4: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den Bismut- Konzentrationen im Urin des Probanden 115.	67
Abbildung 5-5: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den Bismut- Konzentrationen im Urin des Probanden 113.	67

Abbildung 5-6: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluft- und Blutproben des Probanden 104	69
Abbildung 5-7: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluft- und Blutproben des Probanden 113	70
Abbildung 5-8: Gegenüberstellung der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft des Probanden 115.	70
Abbildung 5-9: Gegenüberstellung der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft des Probanden 113.	71
Abbildung 5-10: Profile der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut eines Probanden nach Gabe von 215 mg bzw. 430 mg Bismut	72
Abbildung 5-11: Bismut-Konzentrationen in Urinproben nach Gabe von 215 mg Bismut	73
Abbildung 5-12: Bismut-Konzentrationen in Urinproben nach Gabe von 430 mg Bismut	74
Abbildung 5-13: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den Bismut-Konzentrationen im Urin nach Gabe von 215 mg Bismut	74
Abbildung 5-14: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den Bismut-Konzentrationen im Urin nach Gabe von 430 mg Bismut	75
Abbildung 5-15: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut ...	76
Abbildung 5-16: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut ...	76
Abbildung 5-17: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch I)	77
Abbildung 5-18: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch II)	78
Abbildung 5-19: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 430 mg Bismut	78
Abbildung 5-20: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 215 mg Bismut	79
Abbildung 5-21: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 430 mg Bismut	80
Abbildung 5-22: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut	82
Abbildung 5-23: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut	82
Abbildung 5-24: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch I).	83

Abbildung 5-25: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch II).	83
Abbildung 5-26: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut.	84
Abbildung 5-27: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch I).....	84
Abbildung 5-28: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch II)	85
Abbildung 5-29: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut	85
Abbildung 5-30: Chromatogramm des ethylierten Zelllysats nach 24-stündiger Inkubation mit Bismutsubcitrat und Purge&Trap-Probenaufgabe	86
Abbildung 5-31: Massenspektrum von Monomethyldiethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutsubcitrat und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat	87
Abbildung 5-32: Massenspektrum von Triethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutsubcitrat und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat.	88
Abbildung 5-33: Chromatogramm des ethylierten Zelllysats nach 24-stündiger Inkubation mit Bismutcystein und Purge&Trap-Probenaufgabe.....	88
Abbildung 5-34: Simultane Signale des EI-MS und des ICP-MS nach Ethylierung von HepG2-Zellen, die mit Bismutcystein inkubiert wurden. Die beiden Bismut-Signale des ICP-MS korrelieren mit den Bismut-Spezies, die <i>via</i> GC separiert und mit EI-MS identifiziert wurden	89
Abbildung 5-35: Chromatogramm der Headspace-Analytik des ethylierten Nährmediums nach 24-stündiger Inkubation mit Bismutglutathion	89
Abbildung 10-1: Probenahmeprotokoll der Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora	130
Abbildung 10-2: Chromatogramm des Blindwertes nach Ethylierung der Nährlösung mit Natriumtetraethylborat	159

Abbildung 10-3: Massenspektrum von D3 mit der Retentionszeit von 10,95 min	159
Abbildung 10-4: Massenspektrum von D4 mit der Retentionszeit von 11,91 min	160
Abbildung 10-5: Massenspektrum von D5 mit der Retentionszeit von 12,72 min	160
Abbildung 10-6: Massenspektrum von D6 mit der Retentionszeit von 13,54 min	161
Abbildung 10-7: Massenspektrum von Monomethyldiethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutcystein und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat	161
Abbildung 10-8: Massenspektrum von Triethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutcystein und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat	162

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Physikalische und chemische Kenndaten des Bismuts	2
Tabelle 3-1:	Eingesetzte Gase	35
Tabelle 3-2:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	35
Tabelle 3-3:	Standards und Referenzmaterialien.....	36
Tabelle 3-4:	Laborzubehör im Institut für Umweltanalytik	37
Tabelle 3-5:	Nährmedien und Zelllinie der Zellversuche.....	39
Tabelle 3-6:	Laborzubehör im Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin.....	39
Tabelle 3-7:	Komponenten des GC/MS-Systems.....	40
Tabelle 3-8:	Betriebsparameter des GC/MS-Systems	41
Tabelle 3-9:	Komponenten des ICP-MS.....	41
Tabelle 3-10:	Technische Daten der Chromatographiesäule und der Kühlfalle.....	42
Tabelle 3-11:	GC-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung	44
Tabelle 3-12:	EI-MS-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung.....	44
Tabelle 3-13:	ICP-MS-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung	45
Tabelle 4-1:	Temperaturprogramme der Mikrowellendruckaufschlüsse für diverse Matrices.....	55
Tabelle 4-2:	Temperaturprogramm des GC-Ofens.....	57
Tabelle 4-3:	Injektoreinstellungen	58
Tabelle 4-4:	Messbedingungen bei der Analytik von Fäzesproben <i>via</i> GC/MS	58
Tabelle 4-5:	GC-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung	59
Tabelle 4-6:	EI-MS-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung.....	60
Tabelle 4-7:	ICP-MS Parameter der GC/EI-MS/ICP-MS Messung.....	60
Tabelle 5-1:	Anzahl der Probanden, bei denen zu spezifischen Zeitpunkten (CH ₃) ₃ Bi nachgewiesen wurde.	68
Tabelle 5-2:	Übersicht zu den (CH ₃) ₃ Bi-Maxima nach Bismutgabe.....	79
Tabelle 6-1:	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Bismut und (CH ₃) ₃ Bi in den untersuchten humanen Matrices.....	94
Tabelle 6-2:	Massenbilanzen der einzelnen Bismutstudien.....	100
Tabelle 10-1:	Detaillierte Daten zu den Teilnehmern der Probandenstudien.....	129
Tabelle 10-2:	Bismut-Konzentrationen in Blutproben	131
Tabelle 10-3:	Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben	135
Tabelle 10-4:	Zeiträume und Massen des renal eliminierten Bismuts.....	140

Tabelle 10-5:	Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben	141
Tabelle 10-6:	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben.....	142
Tabelle 10-7:	Übersicht des als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ exhalieren Bismuts	145
Tabelle 10-8:	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben	145
Tabelle 10-9:	Bismut-Konzentrationen in Blutproben	149
Tabelle 10-10:	Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben	151
Tabelle 10-11:	Zeiträume und Massen des renal eliminierten Bismuts.....	153
Tabelle 10-12:	Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben	153
Tabelle 10-13:	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben.....	154
Tabelle 10-14:	Übersicht des als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ exhalieren Bismuts	156
Tabelle 10-15:	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben	156
Tabelle 10-16:	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben	158
Tabelle 10-17:	Übersicht zur fäkalen Eliminierung von Bismut als $\text{Bi}(\text{CH}_3)_3$	158

Abkürzungsverzeichnis

α	Selektivitätsfaktor
A	Ampere oder Eddy-Diffusion
Å	Ångström (10^{-10} m)
A_r	relative Atommasse
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AD	Außendurchmesser
AES	Atomemissionsspektrometrie
AFS	Atomfluoreszenzspektroskopie
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Arsentriglutathion
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve)
B	Longitudinaldiffusion
BG	Bestimmungsgrenze
BiOCl	Bismutoxychlorid
BSN	Bismutsubnitrat
BSS	Bismutsubsalcylat
CBS	Kolloidales Bismutsubcitrat (engl. colloidal bismuth subcitrate)
CEM	Kanalelektronenvervielfacher (engl. channel electron multiplier)
CRM	zerifiziertes Referenzmaterial (engl. certified reference material)
cis-DDP	cis-Diammindichloroplatin(II), Cisplatin, Platinex [®]
cit	Citration
C_M	Massentransferkoeffizient der mobilen Phase
C_S	Massentransferkoeffizient der stationären Phase
D	Diffusionskoeffizient
D3	Hexamethylcyclotrisiloxan
D4	Octamethylcyclotetrasiloxan
D5	Decamethylcyclopentasiloxan
D6	Dodecamethylcyclohexasiloxan
DMA(III)	Dimethylarsenige Säure
DMA(V)	Dimethylarsinsäure
DMAG	Dimethylarsenglutathion
DMSO	Dimethylsulfoxid

DOTA	1,4,7,10-tetra-azacyclo-dodecan-1,4,7,10-tetraacetat
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
E ₀	Standardpotenzial
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EC	Enzymkommission (engl. Enzyme commission)
EI	Elektronenstoßionisation
EKG	Elektrokardiogramm
ESI	Elektrosprayionisation
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure spectroscopy
FKS	fötales Kälberserum
f	Frequenz
GC	Gaschromatograph/Gaschromatographie
GC/EI-MS/ICP-MS	Parallele Detektion <i>via</i> EI-MS und ICP-MS nach gaschromatographischer Trennung
GSH	Glutathion
GST-Omega	Glutathion-S-Transferase-Omega
Hcit	Citronensäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HETP	Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens (engl. height equivalent to a theoretical plate)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HSAB-Modell	hard-soft acid-base Modell nach Pearson
I _a	Assoziativ aktivierter Mechanismus
ICP-MS	Induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer
ID	Innendurchmesser
IDMS	Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (engl. isotope dilution mass spectrometry)
IHK	Interelement-Interaggregat-Kalibrierung
IS	Interner Standard
K	Kelvin
k'	Kapazitätsfaktor
kV	Kilovolt
KZ	Koordinationszahl
L	Länge

LD	Letale Dosis
LT-GC/ICP-MS	Tieftemperatur-Gaschromatographie gekoppelt mit einem induktiv gekoppeltem Plasma-Massenspektrometer
MADG	Methylarsendiglutathion
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MEM	Minimum Essential Medium
MMA(III)	Monomethylarsenige Säure
MMA(V)	Monomethylarsonsäure
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
m/z-Verhältnis	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
N	Anzahl theoretischer Trennstufen, Bodenzahl
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NMR	Kernresonanzspektrometrie (engl. nuclear magnetic resonance)
NOAEL	Toxikologischer Endpunkt in der Toxizitätsbestimmung (engl. no-observed-adverse-effect level)
NWG	Nachweisgrenze
OMCTS	Oktamethylcyclotetrasiloxan
Pa	Pascal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PFA	Perfluoralkoxy
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTV	temperaturprogrammierbare Verdampfung (engl. programmed temperature vaporisation)
r	Quadrupolradius
R	Auflösung (engl. resolution)
RBC	Ranitidin-Bismutcitrat
RSF	Relativer Empfindlichkeitsfaktor
S	Siemens
SAHC	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher

SH-Gruppe	Thiolgruppe
SKT	Skalenteile
S_N^2	Nucleophile Substitution 2. Ordnung
Sdp.	Siedepunkt
t'_R	Netto-Retentionszeit
t_0	Totzeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_R	Retentionszeit
u	Lineargeschwindigkeit des Lösungsmittels oder atomare Masseneinheit
V	Volt oder Wechselspannung
VSEPR	valence shell electron pair repulsion
W	Watt oder Peak-Basisbreite
z	Ladungszahl

1 Einleitung

Es ist bekannt, dass die Toxizität von Metall(oid)en essentiell von der chemischen Form, d. h. der Elementspezies, abhängt (HIRNER UND EMONS 2004; DOPP ET AL. 2004; CRAIG 2003; EBDON ET AL. 2001; THAYER 1984). Im Besonderen scheint die Alkylierung zu einem beachtlichen Anstieg des toxischen Potenzials zu führen, wie die Methylquecksilber-Intoxikation von Anwohnern der Minamata Bucht in Japan (HARADA 1995), die Vergiftung von vielen tausend Irakern mit Monomethylquecksilber-kontaminiertem Getreide (CLARKSON ET AL. 1976), die Di- und Triethylzinn-induzierte Vergiftung von Patienten, welche mit dem Bakterizid Stalinon behandelt wurden (THAYER 1984), und zuletzt der Tod der amerikanischen Biochemikerin Karen Wetterhahn nach einem Unfall mit Dimethylquecksilber gezeigt haben (NIERENBERG ET AL. 1998). Die erhöhte Toxizität dieser alkylierten Metall(oid)spezies resultiert vermutlich aus der höheren Lipophilie dieser Verbindungen, wodurch eine Penetration durch Membranen wie z. B. der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht wird (HIRNER UND EMONS 2004; CRAIG 2003; EBDON ET AL. 2001).

Viele Studien haben gezeigt, dass in der Umwelt methylierte und hydrierte Spezies von einigen Metall(oid)en (z. B. Quecksilber, Zinn, Blei, Arsen, Antimon, Bismut und Selen) durch verschiedene Mechanismen der Biomethylierung gebildet werden (CRAIG 2003). Im Besonderen wurde davon berichtet, dass Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze an dieser speziellen Umwandlung beteiligt sind (THAYER 2002).

Im Gegensatz zum umfangreichen Wissen über die Interaktion von Mikroorganismen mit Metall(oid)en in der Umwelt ist derzeit ein Informationsmangel über entsprechende Prozesse im menschlichen Körper vorhanden. Dieser Mangel ist gerade deshalb auffällig, weil bestimmte Segmente des Verdauungstraktes wie z. B. die Mundhöhle und das Kolon mit Myriaden von Mikroorganismen besiedelt sind.

Auch die Schwierigkeit, metall(oid)organische Verbindungen im Spuren- und sogar im Ultraspurenbereich zu messen, könnte zumindest teilweise für diese Wissenslücke verantwortlich sein. Metall(oid)organische Verbindungen können erst seit den frühen 1990er Jahren, als die online-Kopplung von chromatographischen Methoden mit dem induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometer (ICP-MS) technisch realisiert wurde, routinemäßig bestimmt werden (FELDMANN UND HIRNER 1995; FELDMANN ET AL. 1994).

2 Thematische Grundlagen

2.1 Bismut

Das rötlich-weiß glänzende Metall Bismut, welches mit Stickstoff, Phosphor, Arsen und Antimon in der Gruppe 15 des Periodensystems steht, galt bis zum Jahr 2003 als schwerstes stabiles Element, bis ein α -Zerfall bei einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1,9 \cdot 10^{19}$ Jahren detektiert werden konnte (DE MARCILLAC ET AL. 2003). In der Natur kommt Bismut überwiegend gebunden als Bi_2O_3 und Bi_2S_3 vor und ist oftmals Begleitmetall von Blei-, Kupfer- und Zinnerzen. Trotz vieler bekannter Isotope ist ^{209}Bi das einzig natürlich vorkommende. Im Vergleich zu den übrigen Elementen der Stickstoffgruppe bevorzugt Bismut die Oxidationsstufe +III, während Bi(V) aufgrund des hohen Redoxpotenzials ($E^\circ_{\text{Bi(V)}/\text{Bi(III)}} = 2,03 \text{ V}$) sehr reaktiv ist; die hohe Stabilität des Bi(III) ist auf den Inert-Pair-Effekt zurückzuführen. Einige physikalische und chemische Kenndaten des Bismuts sind in Tabelle 2-1 angegeben.

Tabelle 2-1: Physikalische und chemische Kenndaten des Bismuts (HOLLEMAN UND WIBERG 2007; ENGHAG 2004)

Ordnungszahl	83
Relative Atommasse A_r	208,98037
Natürliche Isotopenhäufigkeit ^{209}Bi	100 %
Kristallstruktur	rhomboedrisch
Vorkommen in der Erdkruste (mg/kg)	0,2
Vorkommen im Meer (mg/l)	$2 \cdot 10^{-5}$
Dichte (g/cm)	9,80
Schmelzpunkt/Siedepunkt ($^\circ\text{C}$)	271,3/1580
Spezifische Leitfähigkeit (S/cm)	$9,36 \cdot 10^3$
Wärmeleitfähigkeit (W/(m·K))	7,8
Magnetismus	diamagnetisch
Atomradius (\AA)	1,82
Oxidationsstufen	0, +1, +2, +3, +4, +5
Redoxpotential des Systems Bi(III)/Bi(V) (V)	2,03
Ionenradius Bi(III) (\AA)	1,17 (KZ = 6); 1,31 (KZ = 8)
Ionenradius Bi(V) (\AA)	0,90 (KZ = 6)
Kernspinquantenzahl	9/2

Bismut wurde früher oftmals als Letternmetall verwendet und ist in der heutigen Zeit ein wichtiger Bestandteil niedrigschmelzender Legierungen (Woodsches und Roses Metall). Auf-

grund seiner vermeintlichen toxikologischen Unbedenklichkeit (PALMIERI 1993) wird Bismut nicht nur als Bleiersatz in Automatenstählen, sondern auch als Pigment (Bismutoxychlorid, BiOCl) in der Kosmetikindustrie eingesetzt. Des Weiteren wird Bismut seit 200 Jahren in der Medizin verwendet (siehe 2.2).

Für die Umwelt hatte der Einsatz verschiedener Bismut-Verbindungen zur Folge, dass über die Abwässer größere Mengen dieses Elements in den Klärschlämmen der Wasseraufbereitungsanlagen akkumulieren. Bismut-Konzentrationen von 1 bis 5 mg/kg Trockengewicht wurden nachgewiesen (MICHALKE ET AL. 2000). Als Konsequenz dieses anthropogenen Eintrags wurde die Bildung von Trimethylbismut ($(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$) in Deponie- und Klärschlammgasen gezeigt (FELDMANN ET AL. 1994); darüber hinaus wurde auch ein biogener Ursprung dieser Bismut-Spezies belegt (MICHALKE ET AL. 2000).

2.2 Bismut in der Medizin

Die Verwendung von Bismut-Verbindungen in der Medizin kann bis ins Mittelalter zurückverfolgt werden. Der erste Bericht über die Anwendung von Bismut als Medikament stammt aus dem Jahr 1786 von Louis Odier zur Behandlung der Dyspepsie (HOCHRADEL 1928). Bis heute wurden, basierend auf dem fortschreitenden Verständnis der Eigenschaften des Bismuts, viele Verbindungen synthetisiert, von denen einige in der Medizin verwendet werden. Gegenwärtig kann die wesentliche medizinische Anwendung des Bismuts und seiner Verbindungen auf die antimikrobielle Behandlung von *Helicobacter pylori*-Infektionen und die der radioaktiven Isotope auf die Krebstherapie eingegrenzt werden (YANG UND SUN 2007; BURFORD UND EELMAN 2005; SUN ET AL. 2004; KLOTZ 2000; SLIKKERVEER UND DE WOLFF 1989; WAGSTAFF ET AL. 1988).

2.2.1 Bismut als antimikrobieller/entzündungshemmender Wirkstoff

Verschiedene Bismut-Verbindungen wurden zur Behandlung einiger mikrobieller Infektionen und zur Entzündungshemmung eingesetzt, z. B. gegen Syphilis (Natrium/Kalium-Bismuttartrat, Bis-mutchininiodid, Iodobismitol, Bismutchlorid, etc.), Colitis (Bismutsubnitrat und Bismut-citrat), Wundinfektionen (Bismutoxid), Malaria quartana (Natrium-Bismut-thioglykolat), Dyspepsie (Bismutsubsaliicylat, Bismutsubnitrat, etc.), Diarrhöe (Bismutsubsaliicylat, Bismutnitrat, etc.) sowie Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren (kolloidales Bismutsubcitrat, Bismutcitrat, Bismutsubnitrat, etc.) (BRIAND UND BURFORD 1999; BAXTER 1992). Die drei Bismut-Verbindungen Bismutsubsaliicylat (BSS, Pepto-Bismol[®], The Procter & Gamble Company), kolloidales Bismutsubcitrat (CBS, De-Nol[®], Gist Brocades und Yamanouchi) und Ranitidin-Bismutcitrat (RBC, Tritec[®] und Pylorid[®],

GlaxoSmithKline) werden weltweit zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten des Gastrointestinaltraktes angewendet, welche im Zusammenhang mit *Helicobacter pylori*, einem 1983 entdeckten Mikroorganismus (MARSHALL UND WARREN 1984), stehen.

2.2.2 Bismut in der Krebstherapie

Die Isotope ^{212}Bi ($t_{1/2} = 61 \text{ min}$) und ^{213}Bi ($t_{1/2} = 46 \text{ min}$) sind α -Teilchen emittierende Radionuklide mit linearem Energietransfer und wesentlich wirksamer als β -Strahler wie z. B. ^{90}Y (HASSFJELL UND BRECHBIEL 2001 A UND B; IMAM 2001). Beide Nuklide haben eine verzweigte Zerfallsreihe, die in einer Emission von α -/ β -Teilchen und γ -Strahlung resultieren (Abbildung 2-1). Ähnlich wie andere α -Strahler senden ^{212}Bi und ^{213}Bi korpuskulare Strahlung mit einer geringen Reichweite aus (50–80 μm), welche hierdurch potenziell die nichtspezifische Bestrahlung des normalen Gewebes um die Zielzellen reduzieren könnte. Neuere Untersuchungen haben ein vielversprechendes Potenzial von ^{213}Bi als neuem therapeutischen Agens für Tumore mit kleinen Volumina gezeigt. Die kurzen Halbwertszeiten von ^{212}Bi und ^{213}Bi erfordern hierbei einen schnellen Transport der verabreichten Dosis und somit zugleich eine schnelle Bindungsausbildung des Metalls an Transportmoleküle. Die beiden Isotope können aus ^{224}Ra and ^{225}Ac erzeugt werden (Abbildung 2-1, BURKE ET AL. 2002; JURCIC 2001; KOZAK ET AL. 1986); zudem wurde ein ^{213}Bi -Generator für die klinische Anwendung entwickelt (MCDEVITT ET AL. 2000, 1999 A UND B, 1998).

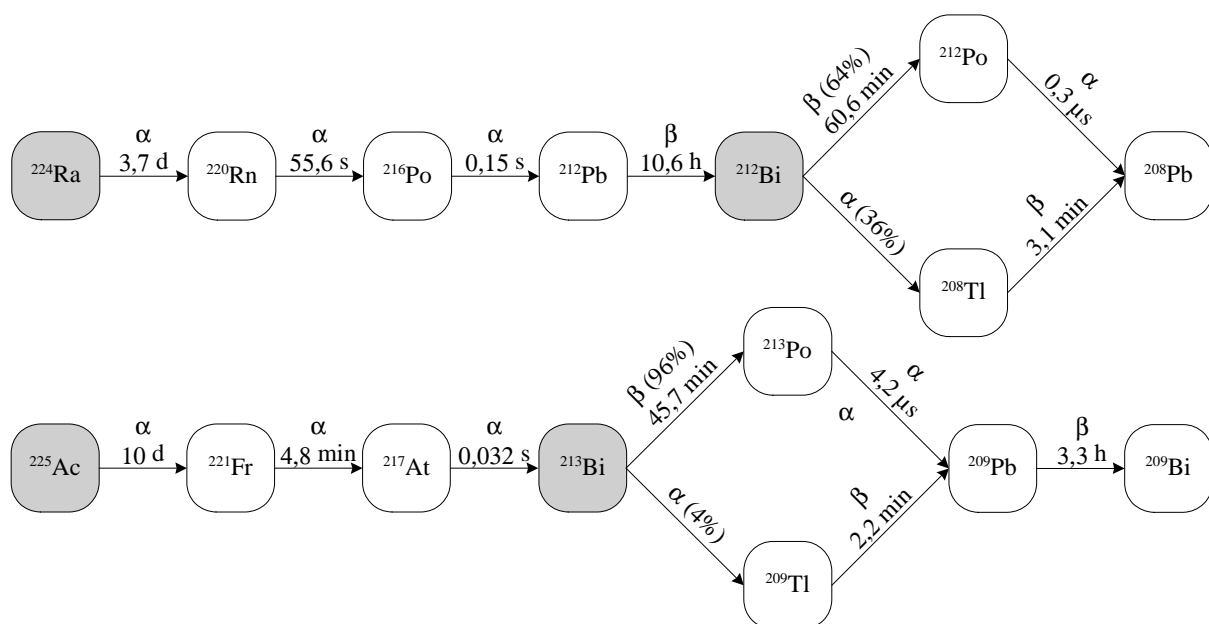


Abbildung 2-1: Radioaktives Zerfallsschema des ^{212}Bi und ^{213}Bi (HOLLEMAN UND WIBERG 2007, S. 1885)

Um Bismut effektiv zum Ort der Erkrankung führen zu können, wird es immer in Form eines stabilen Komplexes aus dem Radionuklid und einem Chelat-Liganden wie die Aminopolycarboxylat- oder Polyaminopolycarboxylat-Liganden (Iminodiacetat, Nitrilotriacetat, Pyridindicarboxylate, Diethylentriaminpentaacetat (DTPA), 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetat (DOTA) und Porphyrine) (HALIME ET AL. 2004; HASSFJELL UND BRECHBIEL 2001) verwendet. Noch häufiger wird der starke Chelat-Ligand an einem tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder Fusionsprotein gebunden - dies entspricht einer üblichen Vorgehensweise bei der Bekämpfung von Tumoren - um durch die Modifikation des Liganden eventuell einen Bismut-radiomarkierten "Komplex" zu erhalten. Auf diesem Weg kann der dann radiomarkierte „Komplex“, einmal in den Wirt eingeführt, spezifisch Zelltypen oder Krankheitsherde bekämpfen (RIZVI ET AL. 2006; MULFORD ET AL. 2005; BURKE ET AL. 2002; JURCIC 2001), indem er α -Teilchen nur am oder im Tumorgewebe freisetzt und dadurch den Schaden am umgebenen Gewebe minimiert.

2.2.3 Kolloidales Bismutsubcitrat

Kolloidales Bismutsubcitrat (CBS, De-Nol[®] und Lizhudele[®]) ist neben anderen neueren Bismut-haltigen Medikamenten eines der meistverbreiteten Bismut-Arzneien in einigen Ländern (SUERBAUM UND MICHETTI 2002).

Bei der Behandlung *Helicobacter pylori*-induzierter Ulzera besteht die Funktion des CBS möglicherweise in der Bildung „polymerer Schichten“ aus Bismutcitrat, die den Ulcus vor weiterer Erosion durch die Magensäure schützen soll (SUN ET AL. 2004; LAMBERT UND MIDOLO 1997).

Die empirische Formel von CBS wurde bisher mit $K_3(NH_4)_2[Bi_6O_3(OH)_5(Hcit)_4]$ angegeben (MERCK INDEX 1989), jedoch erfolgte eine Modifizierung in „polymerer Bismutcitrat-Komplex“ (MERCK INDEX 2006), um die komplizierten Funktionen des Polymers herauszustellen. So wurden neun verschiedene Bismutcitrat-Addukte unter verschiedenen Bedingungen isoliert und *via* Röntgen-Kristallographie und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die meisten von ihnen enthalten das stabile $[Bi(cit)_2Bi]^{2-}$ -Dimer mit zusätzlichen O^{2-} , OH^- und H_2O -Liganden. Diese dimere Einheit kann weiterhin über Citrat-Brücken Kanäle und über Wasserstoffbrückenbindungen Schichten ausbilden, worin möglicherweise die Begründung für die hohe Löslichkeit von CBS zu suchen ist. Die Löslichkeit von CBS ist stark vom pH-Wert und der Ionenstärke abhängig und liegt im Bereich von mehreren hundert Milligramm pro Milliliter in reinem Wasser bis hin zu weniger als einem Milligramm pro Milliliter bei sauren pH-Werten und großer Ionenstärke (SUN ET AL. 2004).

Zur Aufklärung der Struktur von CBS wurden zudem weitere Anstrengungen unternommen. Vor kurzem wurde die Struktur eines Bismutcitrat-Komplexes unter den Bedingungen des menschlichen Magens bei pH 3 aufgeklärt. Hierbei wurden drei Arten von Bismutcitrat-Dimeren $[\text{Bi}(\text{cit})_2\text{Bi}]^{2-}$ erkannt. Diese Dimere fungieren als Baueinheiten und ordnen sich in einer zweidimensionalen Schicht und einem dreidimensionalen Polymer an (LI ET AL. 2003). Dies könnte einen möglichen Prozess offenbaren, bei dem sich CBS von kolloidalen Teilchen wie $[\text{Bi}_6\text{O}_4(\text{cit})_4]^{6-}$ und $[\text{Bi}_{12}\text{O}_8(\text{cit})_8]^{12-}$ bei pH 7 (ASATO ET AL. 1995) zu Flächen und dreidimensionalen Polymeren unter sauren Bedingungen (z. B. im Magen) infolge eines schnellen Ligandenaustausches umlagert, wie mittels NMR-Spektroskopie gezeigt wurde (LI ET AL. 2003). Die Gegenwart von Kanälen (ca. 5 Å) im Bismutcitrat-Polymer könnte anderen Molekülen wie z. B. Ranitidin, einem Arzneistoff zur Kontrolle der Magensäureproduktion, die Diffusion in die Hohlräume ermöglichen.

2.2.4 Pharmakokinetik und Toxizität von Bismut-Verbindungen

Bismut kann als Ergebnis der gastrointestinalen Resorption sowohl lokal im Magen als auch systemisch wirken. Nach oraler Einzelgabe von Bismut-Medikamenten wie CBS und BSS wird angenommen, dass sich eine protektive Schicht über dem Ulcuskrater bildet. Die Bismut-Konzentrationen im Blut stiegen nach der Einnahme unerwartet schnell innerhalb der ersten 60 Minuten an (HESPE ET AL. 1988). Nach der Einnahme einer therapeutischen Einzeldosis CBS wurde das Bismut-Konzentrationsmaximum hierbei nach 30 Minuten erreicht. Ein signifikanter Anstieg der Bismut-Konzentrationen im Blut (17-38 ng/ml) wurde auch nach oraler Gabe von Bismut-Verbindungen an gesunde Probanden beobachtet (SLIKKERVEER UND DE WOLFF 1989). Die Bismut-Maximalkonzentration im Blutplasma lag nach der Gabe einer einfachen Dosis von RBC, BSS und CBS unterhalb von 30 ng/ml (LAMBERT UND MIDOLO 1997). Die mehrfache Gabe von CBS führte zu einem deutlich stationären Zustand nach 3-4 Wochen unterhalb von 100 ng/ml. Die Einnahme von CBS-Tabletten zeigte Konzentrationspitzen zwischen 25 und 300 ng/ml nach durchschnittlich 30 Minuten (NWOKOLO ET AL. 1989). Eine ^{207}Bi -Studie zeigte zudem, dass die Bismut-Konzentrationen im Humanblut stufenweise fielen, mit einem zunächst schnellen exponentiellen Konzentrationsabfall ($t_{1/2} \approx 60 \text{ min}$), auf den ein sehr langsamer Eliminationsschritt folgte. Hierbei sank die Bismut-Konzentration im Blut innerhalb von 7 Stunden auf lediglich 1 % der initialen Maximalkonzentration. Nach 18 Tagen erreichte die Bismut-Konzentration im Blut nur noch 0,1 % des Maximalwertes (NEWTON ET AL. 2001). Ein ähnliches Eliminationsmuster wurde bei einer Studie mit chinesischen Probanden beobachtet, deren Blutproben *via* ICP-MS untersucht wurden.

Die Resorption von Bismut wurde nach Gabe von CBS oder Bismutsubnitrat nicht durch die Anwesenheit eines Ulkus beeinflusst (HUNDAL ET AL. 1999).

Im Blut sollte Bismut sowohl mit dem Blutplasma als auch mit den Erythrozyten binden. Verschiedene Untersuchungen konnten jedoch keine zusammenhängenden Konzentrationsmuster zwischen diesen beiden Blutbestandteilen zeigen. Tierversuche mit Ratten ergaben hingegen, dass nach der Gabe von markiertem CBS das ^{205}Bi hauptsächlich den Erythrozyten zugeordnet werden konnte (DRESOW ET AL. 1991).

Andere Ergebnisse zeigten zudem die Bismut-Aufnahme durch Erythrozyten. Hierbei wurde im Rattenblut nahezu das gesamte Bismut in den roten Blutkörperchen gefunden (RAO UND FELDMAN 1990 A UND B).

Studien mit ^{206}Bi -markiertem Bismutcitrat wiesen darauf hin, dass Bismut leicht an Serumproteine gebunden wird (83 % nach einer Stunde bei physiologischem pH) und dass diese starke Bindung nicht durch Dialyse gegen einen Phosphatpuffer umgekehrt werden konnte (RUSS ET AL. 1975).

Eine Gelfiltrationsstudie von Humanblut nach Inkubation mit Bismutsubgallat zeigte eine Assoziation von Bismut und hochmolekularen Liganden (THOMAS ET AL. 1983).

2.2.4.1 Verteilung von Bismut in Geweben

Der schnelle Anstieg der Bismut-Konzentrationen im Blut von Menschen und Tieren nach der Aufnahme von CBS deutet auf eine gastrische Resorption hin. Die Resorption hängt hierbei hauptsächlich von den Eigenschaften des Bismut-Komplexes/-Salzes ab und ist mit < 0,5 % nach Gabe von RBC bzw. CBS sehr gering (SUN ET AL. 2004). NWOKOLO ET AL. (1992) lieferten mit der transmukosalen Penetration (Persorption) von Bismut-Teilchen in der gastrischen antralen Mukosa einen Erklärungsansatz für die schnelle Resorption.

Das oral eingenommene Bismut wird sowohl beim Menschen als auch beim Tier fast vollständig über die Fäzes ausgeschieden und die Eliminierung des resorbierten Bismuts erfolgt relativ schnell über den Urin. Hierbei wird der überwiegende Teil des Bismuts innerhalb eines Tages ausgeschieden.

Die Datenlage zur Verteilung des Bismuts in Geweben ist ähnlich, obwohl grundsätzlich eine große Variation zwischen Human- und Tierexperiment besteht. Die Niere stellte aber immer das Organ mit der höchsten Bismut-Konzentration dar. Nach 14-monatiger Gabe von CBS an Ratten lagen die Bismut-Konzentrationen zwischen 13,9 ng/ml (Feuchtgewicht) in der Niere und bis zu 0,3 ng/ml im Muskelgewebe. Ordnet man die Bismut-Konzentrationen nach ihrer Größe von hoch nach niedrig, so wird folgende Reihenfolge für Organe erhalten:

Niere > Leber > Knochen > Lunge > Milz > Gehirn > Herz (LUPPINO UND MCLEAN 1995).

Dennoch ist eine hohe Aufnahme der Leber ebenso möglich und somit auch die berichtete Eliminierung von Bi(III) über diesen Weg durch komplexierende Plasmaproteine (NEWTON ET AL. 2001).

Die physikochemische Form des verabreichten Bismuts könnte auch die o. g. Reihenfolge beeinflussen. Beispielsweise war nach der oralen Aufnahme von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ die Bismut-Konzentration in der Leber höher als in der Niere; möglicherweise als Folge des höheren organischen Charakters dieses Moleküls (SOLLMANN UND SEIFTER 1939). Direkt nach 15-tägiger oraler Gabe von Bismutsubcitrat konnte Bismut in der Niere, dem Blut, dem Gehirn, der Lunge und der Leber in absteigender Reihenfolge detektiert werden (CANENA ET AL. 1998).

Dem steht ein unterschiedliches Dispositionsmuster nach einer vergleichbaren Dosierung mit RBC gegenüber, bei dem eine signifikant geringere Bismut-Konzentration in der Niere gefunden wurde und kein Bismut im Gehirn detektierbar war (CANENA ET AL. 1998).

Die Speicherzeit von Bismut in der Niere ist zudem etwas höher als in den anderen Organen. Weiterhin wurde bei *In-vivo*-Experimenten gefunden, dass Bismut die N-Cadherin-Expression und -Distribution in proximalen tubulären Epithelzellen vor dem Zelltod beeinflusst; in renalen tubulären Epithelzellen des Typs NRK-52E and LLC-PK1 wurde es *in vitro* gezeigt. Hier müsste noch untersucht werden, ob die Redistribution von N-Cadherin ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese der Bismut-Nephropathie ist (LEUSSINK ET AL. 2001).

Die gefundenen Bismut-Konzentrationen im Gehirn waren höher als in Kontrollproben (LEE ET AL. 1980; HAMILTON ET AL. 1972). Bei Patienten, die an der Bismut-Enzephalopathie gestorben waren, konnte eine um den Faktor zwei höhere Bismut-Konzentration in der grauen Substanz als in der weißen Substanz nachgewiesen werden, wobei die höchsten Konzentrationen im Thalamus und im cerebralen Kortex zu finden waren (ESCOUROLLE ET AL. 1977).

Studien an Mäusen mit Bismut-induzierten neurotoxischen Störungen zeigten, dass die Bismut-Spiegel im Gehirn der beeinträchtigten Mäuse (8 ppm) mit dem Menschen vergleichbar sind (ROSS ET AL. 1988; RIBADEAU-DUMAS ET AL. 1978)

Nach Gabe einer neurotoxischen Dosis (2500 mg/kg i. p.) von Bismutsubnitrat waren die Bismut-Spiegel im Bulbus olfactorius (≈ 7 ppm), Hypothalamus (≈ 7 ppm), Septum (≈ 3 ppm), Hirnstamm (≈ 3 ppm) und Striatum am höchsten. Der cerebrale Kortex wies die geringste Konzentration auf (≈ 1 ppm) (ROSS ET AL. 1994).

Die Akkumulierung im Bulbus olfactorius war aufgrund der Beziehung zwischen Defiziten im Riechvermögen und chronischen neurodegenerativen Krankheiten von speziellem Interesse. Diese Akkumulierung wurde von vielen Forschern berücksichtigt, jedoch nur unzureichend verstanden (ROBERTS 1986).

Die orale Gabe von verschiedenen Bismut-Verbindungen wie BSN, BSS, CBS und RBC führte zur Bismut-Aufnahme in das Nervensystem von Mäusen, mit einer partiellen Affinität gegenüber Motoneuronen und Zellen außerhalb der Blut-Hirn-Schranke (PAMPHLETT ET AL. 2000). Die histochemische Analyse zeigte, dass Bismut sowohl in den Lysosomen von Neuronen und Gliazellen als auch in der Basalmembran einiger Kapillaren akkumulierte (LOCHT ET AL. 2002; STOLTENBERG ET AL. 2001 A, B UND C).

2.2.4.2 Humantoxizität

Erstmalig wurde das Augenmerk auf die Toxizität von Bismut gerichtet, als in der Mitte der 1970er Jahre in Australien, Frankreich und anderen europäischen Staaten neurologische Störungen nach der oralen Aufnahme von Bismut-haltigen Medikamenten aufgetreten waren (BUGE ET AL. 1974 A UND B, BURNS ET AL 1974). Viele humantoxische Effekte wurden Bismut-Komplexen zugeordnet: Enzephalopathien, Nephropathien, Osteoarthropathien, Gingivitis, Stomatitis, Colitis und Hepatitis. Zudem wurden verschiedene adverse Effekte auf unterschiedliche Organsysteme mit Bismut-Komplexen in Verbindung gebracht (SLIKKERVEER UND DE WOLFF 1989). Enzephalopathische Symptome wurden ebenfalls in Gasexpositionsversuchen mit Trimethylbismut ($(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$) bei Katzen und Hunden festgestellt (SOLLMANN UND SEIFTER 1939). Weiterhin besteht die Hypothese, dass durch die Mikroflora des menschlichen Darmtrakts eine Umwandlung der anorganischen Bismut-Verbindungen zu $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ stattfindet, welches dann zu toxischen Effekten führen könnte (MICHALKE ET AL. 2002).

Allerdings werden toxische Effekte bei der normalen Anwendung von BSS, CBS und RBC infolge ihrer geringen Resorption nicht beobachtet (PIPKIN ET AL. 1996).

Die veröffentlichten Bismut-Konzentrationen im Blut von Patienten mit Vergiftungserscheinungen lagen im Intervall zwischen 100 und 2850 ng/ml (Median: 700 ng/ml); verglichen mit 5 bis 100 ng/ml bei asymptomatischen Patienten (HILLEMANN ET AL. 1977). Diese Patienten nahmen eine extrem hohe Dosis eines Bismut-Salzes (10-20 g pro Tag) an 20 Tagen pro Monat auf. Bei den beschriebenen Bismut-induzierten Enzephalopathien hatten 22 Patienten Bismut-Konzentrationen im Blut < 100 ng/ml, 194 Patienten 100 bis ≈ 1000 ng/ml, 70 Patienten 1000 bis ≈ 2000 ng/ml und 24 Patienten > 2000 ng/ml.

Die meisten dieser Patienten hatten ein Bismut-Präparat für einen Zeitraum von 6 Monaten eingenommen (MARTIN-BOUYER ET AL. 1981). SLIKKERVEER UND DE WOLFF (1989) haben Anzeichen und Symptome der Bismut-Enzephalopathie im Detail beschrieben, hauptsächlich von den berichteten Fällen in Frankreich und Australien. Ihre Diagnose wurde grundsätzlich durch die Bestimmung der Bismut-Konzentrationen im Blut, Plasma, und Serum untermauert.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung überstiegen bei Patienten mit Enzephalopathie die Bismut-Konzentrationen im Blut normalerweise 100 ng/ml, aber eine eindeutige Korrelation zwischen klinischen Symptomen und den Bismut-Konzentrationen im Patientenblut war nicht erkennbar. Daher wurde das von Hillemund vorgeschlagene toxische Warnzeichen von 50 bis \approx 100 ng/ml Bismut (HILLEMUND ET AL. 1977; HILLEMUND ET AL. 1976; HILLEMUND UND COTTET 1976) als nicht nachvollziehbar angesehen und als übervorsichtig kritisiert. Es gibt keinen Grund zu schlussfolgern, dass *transient* hohe Bismut-Konzentrationen in Blut/Serum mit der Toxizitätsgefahr in Beziehung stehen (BENET 1991).

Aktuell ist weder ein MAK-Wert oder ein NOAEL (engl. no-observed-adverse-effect level) für den Menschen bekannt, so dass die Toxizität an der Beschreibung adverser Effekte festgemacht wird.

Nach Gabe von zweimal täglich 800 mg RBC über einen Zeitraum von 28 Tagen stiegen die Bismut-Konzentrationen im Blut nicht über 12 ng/ml an (KOCH ET AL. 1996). Zudem wurde ein potentiell Problem der Langzeit-Akkumulierung und Persistenz des Bismuts im Nervensystem vermutet (PAMPHLETT ET AL. 2000).

Transferrin wurde als Hauptziel von Bi(III)-Antizulera-Medikamenten im Blutplasma vorgeschlagen, jedoch ist die biochemische Konsequenz noch unklar (SUN UND SZETO 2003).

Es könnte eine Doppelrolle in der Pharmakologie des Bismuts spielen. Bei sehr kleinen Bi(III)-Konzentrationen könnte die Bindung von Bismut an Transferrin möglicherweise einen Detoxifikationsprozess darstellen, welcher die Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen unterbindet. Ist die Bismut-Konzentration im Blut oder Plasma hingegen zu hoch, könnte etwas Bismut durch Transferrin ins Gewebe oder in andere Organe wie zum Beispiel das Gehirn transportiert werden und Nebenwirkungen verursachen.

Nichtsdestoweniger ist die Bismut-Toxizität normalerweise reversibel und Patienten mit Bismut-induzierten Vergiftungserscheinungen genesen nach der Absetzung der Medikamente oder nach geeigneter medizinischer Versorgung (ISLEK ET AL. 2001; HUDSON ET AL. 1989).

2.3 Biomethylierung von Elementen

Unter Biomethylierung versteht man den enzymatischen Transfer einer vorher gebildeten Methylgruppe eines Donoratoms auf ein Akzeptoratom innerhalb eines lebenden Organismus. Enzyme, welche an einem solchen Transfer beteiligt sind, werden als *Methyltransferasen* bezeichnet. Die wesentlich allgemeinere Bezeichnung der Transmethylierung beschreibt dagegen jede Methyltransferreaktion unabhängig davon, ob lebende Zellen involviert sind. Die Biomethylierung von Kohlenstoff-, Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelatomen wird regel-

mäßig von Organismen als Teil ihres Metabolismus durchgeführt (ZHOU ET AL. 2001; CHENG UND BLUMENTHAL 1999; JOST UND SALUZ 1993); allerdings wurden in der Umwelt auch abiotische Methylierungen und Transmethylierungen von z. B. Quecksilber, Arsen, Zinn, Selen, beobachtet (CELO ET AL. 2006; HIRNER 2006; WEBER 1999; SADIQ 1997).

Untersuchungen unter Mitwirkung der enzymatischen Transmethylierung werden in der Gen- und Krebsforschung immer wichtiger (WATSON AND GOODMAN 2002, JELTSCH 2002, WONG 2001); hierbei finden die Begriffe der Hypo- und Hypermethylierung immer häufiger Verwendung.

Andere Elemente mit einer Ordnungszahl größer als 11 werden auch biomethyliert. Hierbei ist die Datenlage für die Elemente Arsen und Quecksilber sehr umfangreich. Andere Elemente wie z. B. Antimon und Blei finden hingegen weitaus weniger Beachtung, obwohl ihre methylierten Spezies $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ und $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$ eine Rolle bei der Umweltverschmutzung und bei Gesundheitsrisiken spielen (WEBER 1999; TAO UND FATOKI 1997; FATOKI 1997; THAYER 1995; HAMASAKI ET AL. 1995; ERRECALDE ET AL. 1995).

Soweit bekannt, findet die enzymatische Transmethylierung in allen Organismen statt, jedoch methyliert nicht jeder Organismus jedes Element. Die größte Anzahl von Elementen (besonders Metalle) wird vorwiegend von Mikroorganismen, üblicherweise in Sedimenten und Böden, methyliert. Pilze, Hefen und Algen methylieren Halbmetalle und Nichtmetalle (Arsen, Antimon und Halogene), wobei die Methylierung der Halogene im Wesentlichen durch Meer- und Braunalgen erfolgt.

Pflanzen und Tiere scheinen hingegen in ihrem Methylierungsvermögen stark limitiert zu sein, wobei Pflanzen und Tiere weitaus weniger als biomethylierende Systeme untersucht wurden als z. B. einzellige Organismen. Demnach ist diese Aussage als eher spekulativ anzusehen.

Abschließend sollte hervorgehoben werden, dass die Biomethylierungsrate stark von den beteiligten Organismen, der Art des Substrats und der Konzentration abhängt (THAYER 2002).

2.3.1 Biomethylierung und molekulare Eigenschaften

Die Biomethylierung findet fast ausschließlich bei Verbindungen des jeweiligen Elements statt. Hierbei erfordert die Einführung einer Methylgruppe in den Molekülverband generell einen Austausch eines anderen Liganden (meist anorganischer Natur). Ein solcher Austausch kann zur Abschwächung intermolekularer anziehender Wechselwirkungen führen, welche wiederum physikalische Eigenschaften wie z. B. den Siedepunkt und die Löslichkeit beeinflussen. Eine chemische Methylierung des Sauerstoffatoms des Wassers (Sdp. 100 °C) ergibt zunächst Methanol (Sdp. 62,5 °C) und danach Dimethylether (Sdp. -25 °C). Für schwerere

Elemente scheint die Einführung der ersten und/oder der letzten Methylgruppe für drastische Änderungen der physikalischen Eigenschaften verantwortlich zu sein. Diese sukzessiven Änderungen finden bis zur Bildung der permethylierten Spezies ($\text{Bi}(\text{CH})_3$, $\text{As}(\text{CH}_3)_3$, $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ usw.) statt, welche bei Raumtemperatur Gase oder Flüssigkeiten sind (WEBER 1999). Die Einführung einer weiteren Methylgruppe führt zudem zu einer besseren Fettlöslichkeit und somit zu einer verminderten Wasserlöslichkeit. Eine chemische Konsequenz der Methylierung ist die Änderung in der Fähigkeit des Akzeptoratoms zur Komplexbildung und zur Bindung an Oberflächen. Die Biomethylierung führt also zur Veränderung der biologischen Aktivität des Akzeptorelements und damit einhergehend zu einer substanziellen Änderung in der Toxizität. Tatsächlich ist durch Vergiftungen und Todesfälle, die durch methylierte Spezies von Quecksilber und Arsen verursacht wurden, das rasant wachsende Forschungsfeld der Biomethylierung entstanden. Hierbei waren es die Pionierarbeiten Frederick Challengers über die Arsenvolatilisierung durch den Pilz *Scopulariopsis brevicaulis*, die zum Konzept der Biomethylierung geführt haben (CHASTEEN ET AL. 2002; MARTINOV ET AL. 2000; CHALLENGER 1945). Auch heute stellt die Biomethylierung des Arsens in der Umwelt noch ein großes Forschungsfeld dar.

Ebenso haben die Vergiftungen, die durch Biomethylierung von Quecksilber in den Sedimenten der Minamata-Bucht (Japan) und an anderen Orten entstanden sind, einen hohen Beitrag zur Erforschung der Biomethylierung geliefert (BALDI 1997; THAYER 1995).

Weitere Forschungsanreize sind die Konsequenzen, die durch die Mobilisierung infolge der Änderung der physikalischen Eigenschaften auftreten. Die Reduzierung/Anreicherung der Spezies durch Bewegung in der terrestrischen Biosphäre geben Auskünfte über Stoffkreisläufe; zudem ist die Reduzierung zur Sanierung kontaminierter Flächen geeignet, wenn durch die damit einhergehende Mobilisierung keine Lebewesen gefährdet werden.

2.3.2 Mechanismen der Biomethylierung

Während der biologischen Methylierung wird die Methylgruppe eher als verbrückendes Intermediat der Form $[\text{Donor}---\text{CH}_3---\text{Akzeptor}]$ übertragen und nicht über eine „freie“ CH_3 -Gruppe. Dieses Intermediat würde während eines assoziativen Mechanismus, besonders bei einem assoziativ aktivierten Mechanismus (I_a , JANIÁK 2007), gebildet werden. Die Methylgruppe könnte hierbei in Abhängigkeit des spezifischen Donoratoms kationisch (elektrophil), radikalisch oder anionisch (nucleophil) sein und auf der anderen Seite hierüber eine Vorauswahl des Substrats treffen, welches als Akzeptoratom dienen kann. Ist die Transmethylierung gleichzeitig eine Redox-Reaktion, so könnte das inner-sphere Modell für Elektronentransferreaktionen anwendbar sein.

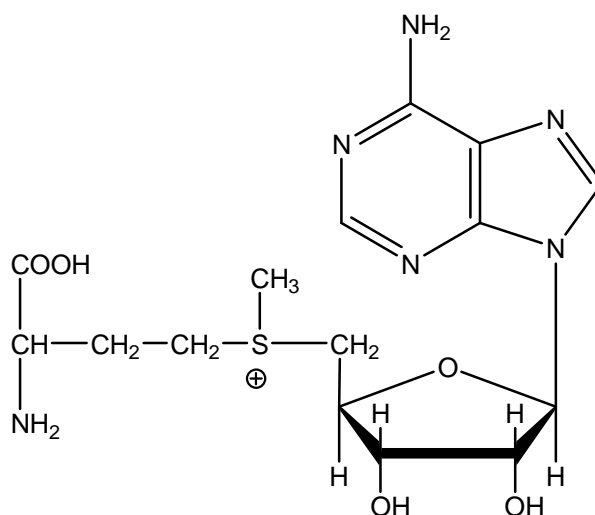
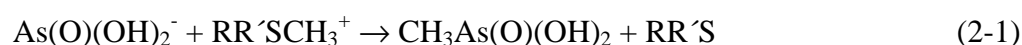


Abbildung 2-2: Strukturformel von S-Adenosylmethionin

Schwerere Elemente werden gewöhnlich von einem und/oder zwei Methylendonatoren biomethyliert: S-Adenosylmethionin (SAM, Abbildung 2-2) und/oder Methylcobalamin (Abbildung 2-5, S. 18). Weiterhin kann die nichtenzymatische Transmethylierung in der unbelebten Natur vorkommen, wo sie eine wichtige Rolle bei der Bildung/dem Abbau von methylierten Metallverbindungen spielen dürfte.

2.3.2.1 Challenger-Mechanismus

Frederik Challenger formulierte einen Mechanismus zur Beschreibung der Biomethylierung des Arsens (CHALLENGER 1945). Hierbei wird in biologischen Systemen das Arsenation (As(V)) zu Arsenit (As(III)) reduziert. Bei den pH-Werten, die in den meisten Organismen vorherrschen, liegt das Arsenit als H_2AsO_3^- vor, weshalb man die Methylierungsreaktion wie folgt darstellen kann:



Der Methylonor $\text{RR}'\text{SCH}_3^+$ ist S-Adenosylmethionin (SAM), dessen Metabolismus und Methylierungsfähigkeiten eingehend untersucht wurden (CHENG UND BLUMENTHAL 1999). Gleichung 2-1 zeigt eine Redox-Reaktion, bei der das Schwefel-Atom des SAM von +4 nach +2 reduziert und das Arsen-Atom von +3 nach +5 oxidiert wird; hierbei hat die reaktive Form des SAM sowohl am α -C-Atom der Aminosäure als auch am Sulfonium-Zentrum (S)-Konfiguration.

Diese Art der Transmethylierung kann als Inner-sphere-Mechanismus, als nucleophiler Angriff des Akzeptoratoms auf die Methylgruppe oder als Säure-Base-Reaktion unter der Ver-

wendung des Hard-Soft-Acid-Base-Modells (HSAB-Modells, PEARSON 1973) angesehen werden.

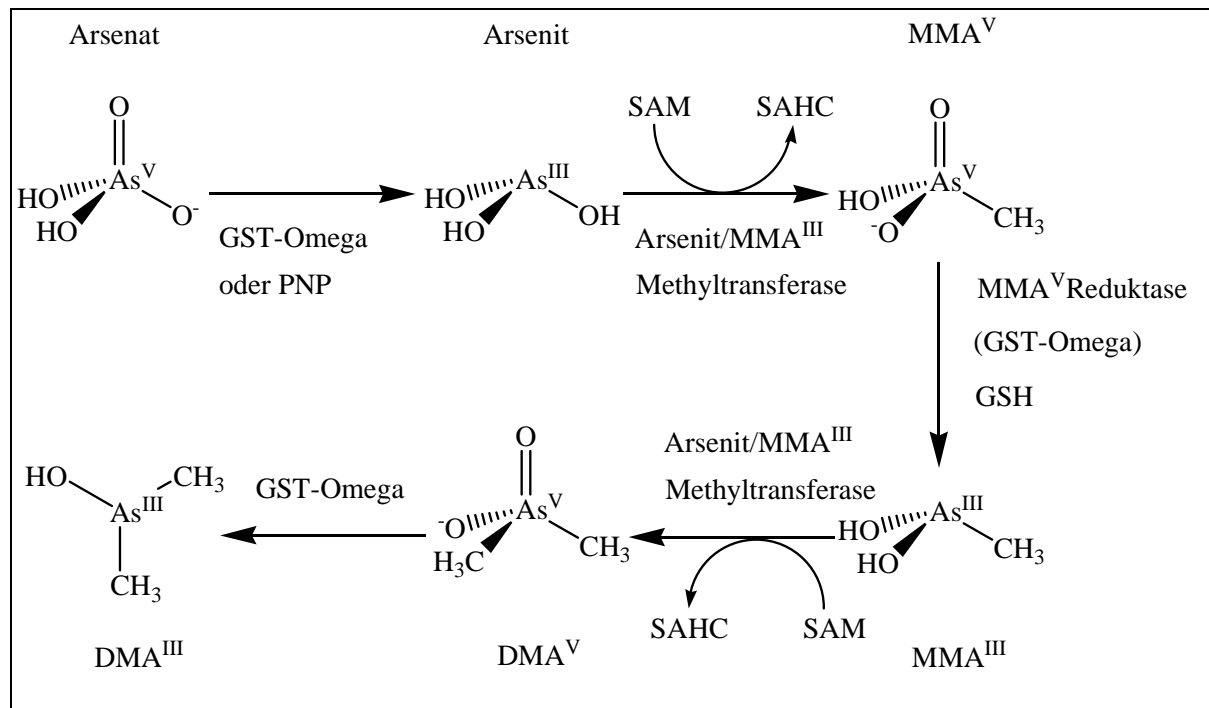


Abbildung 2-3: Generell akzeptierter Weg der Biotransformation anorganischen Arsens (nach CHALLENGER 1945; CULLEN UND REIMER 1989)

Modellstudien mit Methylsulfoniumverbindungen haben gezeigt, dass die Methylierung als nucleophile Substitution 2. Ordnung (S_{N}^2) beschrieben werden kann und der Übergangszustand eine lineare Struktur aufweist. Würde dieser Mechanismus auf Methylierungsreaktionen des SAM angewendet, müsste das Akzeptoratom ein freies Elektronenpaar besitzen. Aber der bloße Besitz eines freien Elektronenpaares (oder mehrerer Elektronenpaare) macht ein Atom noch nicht automatisch für die Biomethylierung zugänglich. Vielmehr ist der Grad der „Weichheit“ des Atoms ein entscheidender Faktor. Im HSAB-Modell reagieren weiche Basen bevorzugt mit weichen Säuren und umgekehrt.

Das Methylcarbokation verhält sich beispielsweise wie eine schwache Säure und geht daher vorzugsweise mit schwachen Basen eine Bindung ein (TOBE UND BURGESS 1999); ein Vorgang, der beim Trimethyloxoniumion ($(\text{CH}_3)_3\text{O}^+$) sehr gut zu beobachten ist. Nominell enthält dieses Ion eine Methylcarbokationsgruppe, welche an ein Sauerstoffatom (eine harte Base) gebunden ist und diese Gruppe auf ein organisches Sulfid (eine weiche Base) überträgt (PETTITT UND HEIMKAMP 1963).

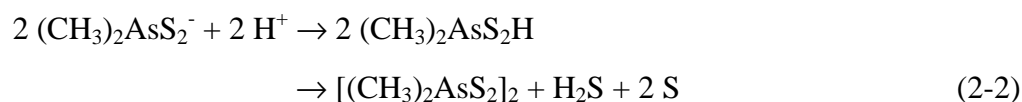
Bei der Biomethylierung des Arsenitons erhält das Arsenatom und nicht ein Sauerstoffatom die Methylgruppe, denn die „Weichheit“ einer Akzeptorbase hängt stark von ihrer chemischen Umgebung ab. In biologischen Systemen scheint zudem eine Aufgabe der Methyltrans-

ferasen zu sein, für eine bessere Zugänglichkeit zum freien Elektronenpaar des Substrats zu sorgen.

Die Biomethylierung von Kohlenstoff benötigt die Bildung eines stabilen carbanionischen Intermediats (CHENG UND BLUMENTHAL 1999). Etwa 120 Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen wurden Nummern der Enzym Kommission (EC) zugewiesen, von denen 55 Sauerstoffatome, 41 Stickstoffatome, 14 Kohlenstoffatome und die übrigen zehn Methyltransferasen Schwefel und/oder andere Elemente biomethylieren. Diese Spezialisierung ist konsistent mit dem HSAB-Modell, da die Transmethylierung von SAM auf Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlenstoffatome andere Bedingungen benötigen sollte als die korrespondierende Transmethylierung auf Schwefel, Arsen und andere schwerere Elemente.

Die Komplexierung durch Thiole scheint für die Biomethylierung von Arsen benötigt zu werden, möglicherweise weil der Ersatz der Sauerstoffatome durch weniger elektronegative Schwefelatome das freie Elektronenpaar des Arsens weicher und somit besser verfügbar für eine eintretende Methylgruppe macht. Auch Arsen(V) ist weniger stabil und kann besser reduziert werden, wenn es an Schwefel gebunden ist. Wässriges Arsenat wird sogar unter neutralen Bedingungen von H_2S zu Arsen(III) reduziert (ROCHETTE ET AL. 2000).

Obgleich Arsen(V)sulfid und Trimethylarsensulfid stabile Teilchen sind, ist das Schwefel-Analogon zur Methylarsinsäure unbekannt und das Dithiocacodylation lediglich in Salzen und Komplexen stabil, welches unter sauren wässrigen Bedingungen zerfällt:



Im Gegensatz dazu sind einige Schwefelverbindungen des Methylarsen(III) bekannt, einschließlich polymeres $(\text{CH}_3\text{AsS})_x$, und mannigfaltige Ringsysteme (STEUDEL ET AL. 1989) der allgemeinen Summenformel CH_3AsS_x . Methylcobalamin methyliert zudem das Arsenion in der Gegenwart von Glutathion (ZAKHARYAN UND APOSHIAN 1999).

Arsen kann sukzessive methyliert werden, wobei jedem Methyltransfer die Reduzierung von Arsen(V) nach Arsen(III) vorausgeht. Methylarsen(III)-Zwischenstufen wurden *in vivo* detektiert (WILDFANG ET AL. 2001; MANDAL ET AL. 2001; GONG ET AL. 2001; LE ET AL. 2000 A UND B; GREGUS ET AL. 2000; SAMPAYO-REYES ET AL. 2000) und können das Krebsrisiko erhöhen (ROY UND SAHA 2002; MANDAL ET AL. 2001, KITCHIN 2001, THOMAS ET AL. 2001; VEGA ET AL. 2001). Mischungen von Methylarsenverbindungen werden gewöhnlich in Organismen gefunden, wobei die relativen Konzentrationen der verschiedenen Komponenten wesentlich variieren können. In Wirbeltieren ist das Kacodylation der primäre Metabolit und wird über den Urin ausgeschieden, wohingegen Mikroorganismen häufig gasförmiges Tri-

methyllarsin produzieren und emittieren. Einige wirbellose Tiere können sogar ein $(\text{CH}_3)_4\text{As}^+$ -Ion bilden und wandeln das Arsen somit in die einzige bekannte Elementspezies um, welche während der Biomethylierung vier Methylgruppen akzeptiert (GEISZINGER ET AL. 2002).

Obwohl Pentamethylarsen $((\text{CH}_3)_5\text{As})$ eine bekannte Verbindung ist (MITSCHKE UND SCHMIDTBAUR 1973; WITTIG UND TORSELL 1953) scheint es aufgrund der Hydrolyse unter biologischen Bedingungen nicht gebildet zu werden.

Viele Elemente werden nach dem Challenger-Mechanismus biomethyliert. Jene, deren Ausgangszustand kein verfügbares freies Elektronenpaar besitzen (gewöhnlich Oxianionen) müssen vor dem Transfer der Methylgruppe reduziert werden.

Einen alternativen Methylierungsweg haben HAYAKAWA ET AL. (2005, Abbildung 2-4) vorgeschlagen. Das besondere an diesem Schema ist, dass die As(III)- vor den As(V)-Spezies gebildet werden. Während der Metabolisierung werden die As(III)-Spezies durch H_2O_2 oder andere Agenzien zu As(V)-Spezies oxidiert, welche hiernach die Endprodukte darstellen.

Zudem schlagen die Autoren dieses Modells Arsentriglutathion (ATG) und Monomethylarsendiglutathion (MADG) als Substrate der Arsen-Methyltransferase CYT 19, einem möglichen methylierendem Enzym, vor. Dieser neue Weg eröffnet weiterhin die Möglichkeit, dass diese Arsen-Glutathion-Verbindungen, um gebildet und oxidiert zu werden, weitere (unbekannte) Enzyme benötigen. Wenn diese Arsen-Glutathion-Verbindungen erst einmal gebildet worden sind, wird die Methylierung durch CYT 19 und S-Adenosylmethionin (SAM) zu MADG und Dimethylarsenglutathion (DMAG) vorgeschlagen. Die methylierten Verbindungen werden nachfolgend zu MMA(V) und DMA(V), den überwiegend im Urin gefundenen Arsenmetaboliten, oxidiert. APOSHIAN ET AL. (2004, 2003) schlagen hierbei vor, dass die giftigere As(III)-Spezies durch H_2O_2 oxidiert und in die weniger toxische As(V)-Spezies umgewandelt wird.

Die Unterschiede zwischen dem neueren und dem bisher akzeptierten Metabolisierungsweg (Abbildung 2-3, S. 14) sind wichtig, obwohl die im Urin detektierbare As(V)-Spezies in beiden Fällen identisch ist.

Am Schema nach Hayakawa überzeugt besonders, dass MMA(V) und DMA(V) als Endprodukte und nicht als Zwischenstufen in der Biotransformation des Arsens vorgeschlagen werden. Das in Abbildung 2-3 dargestellte Schema zeigt hingegen die Anomalie, dass die Hauptzwischenprodukte letztendlich als Endprodukte im Urin zu finden sind.

Einer der Hauptkritikpunkte am vorgeschlagenen Mechanismus ist der fehlende Beweis für die Strukturen der beteiligten Zwischenstufen, also der Arsen-Glutathion-Substrate und Produkte, mit adäquaten Methoden. Der Vergleich von Retentionszeiten kann nicht weiterhin zur

Absicherung einer neuen Arsenspezies verwendet werden. Weiterhin zeigte die Literatursuche, dass humanes CYT 19 nur durch die Technologie der rekombinanten DNA hergestellt werden konnte (LI ET AL. 2005). CYT 19 wurde bisher nicht aus humanem Gewebe isoliert, weshalb die Annahme, CYT 19 sei die Arsenit-Methyltransferase, obwohl sie nicht in der humanen Leber exprimiert wird, momentan nicht vertretbar ist.

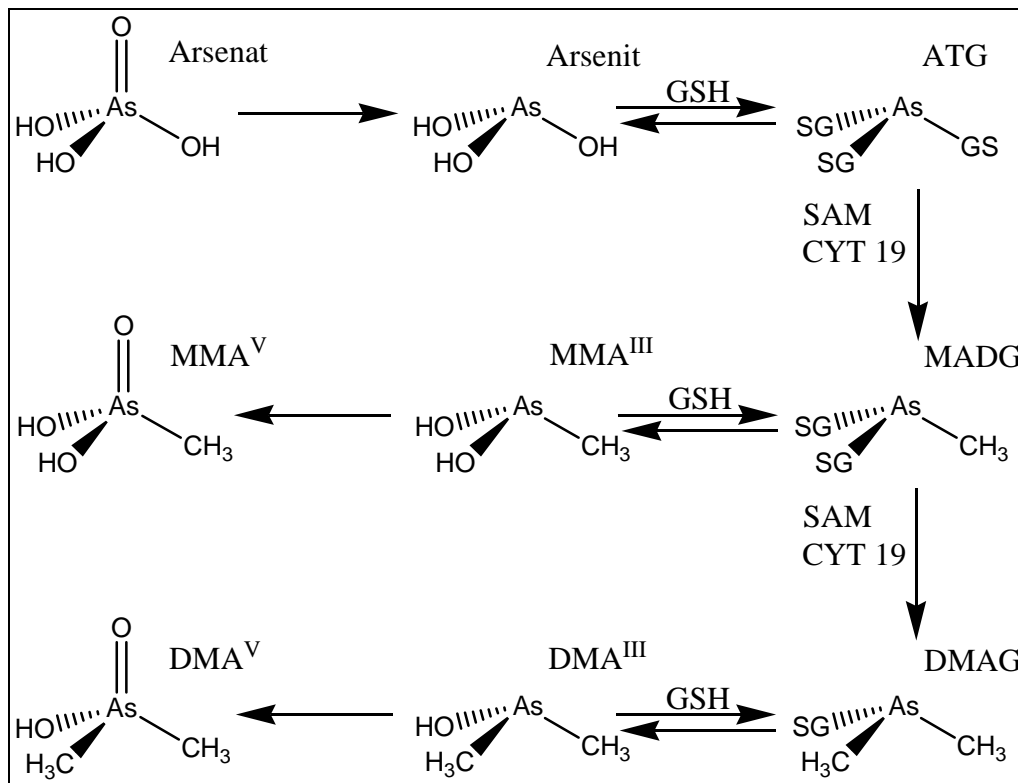


Abbildung 2-4: Alternativer Weg der Biotransformation anorganischen Arsens (HAYAKAWA ET AL. 2005)

2.3.2.2 Methylcobalamin als Methyldonor

Neben SAM ist das Methylcobalamin, eine Form des Vitamin B₁₂, ein weiteres Agens zur Biomethylierung, dessen umfassende Chemie und Biochemie in zwei Monographien zusammengefasst wurde (KRAEUTLER ET AL. 1999; BANERJEE 1999).

Im Unterschied zu SAM könnte das Methylcobalamin seine Methylgruppe als Kation, Anion und als Radikal übertragen. Hierdurch ist die Methylierung einer großen Gruppe von Akzeptoratomen zugänglich. Ein besonders wichtiger Akzeptor ist Homocystein. Durch Methylierung mittels Methionin-Synthetase und Methylcobalamin als Coenzym wird Methionin gebildet, ein Grundbaustein im Metabolismus (MATTHEWS 2001 A UND B; BANDARIN UND MATTHEWS 2001; KRAEUTLER ET AL. 1999; BANERJEE 1999), welches wiederum zu SAM umgewandelt werden kann. Daher kommen die *via* Challenger-Mechanismus übertragenen Methylgruppen in einem vorhergehenden Schritt vom Methylcobalamin.

Die schweren Elemente können sowohl direkt durch Methylcobalamin als auch durch Methylcobalamin-abhängige Methyltransferasen methyliert werden (MATTHEWS 2001 A UND B; BANDARIN UND MATTHEWS 2001; KRAEUTLER ET AL. 1999; BANERJEE 1999). Von einigen Methyltransferasen wurde sogar eine Strukturbestimmung vorgenommen (DOUKOV ET AL. 2000).

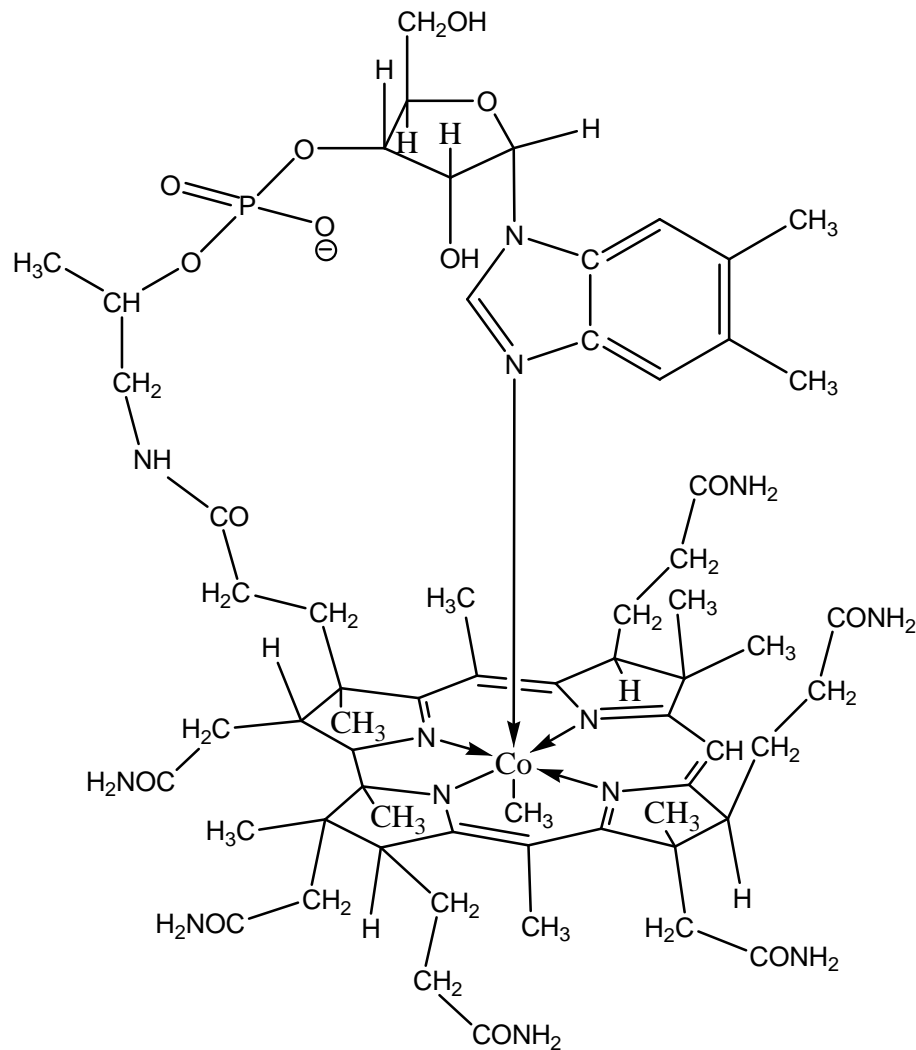


Abbildung 2-5: Strukturformel von Methylcobalamin

Gegenwärtig sind Hg(II)-Verbindungen die meist erwähnten Akzeptorspezies der schweren Elemente, die durch Methylcobalamin methyliert werden (DOUKOV ET AL. 2000). Hg(II) ist eine weiche Säure und das Methylcarbanion ist eine weiche Base, daher sagt das HSAB-Modell voraus, dass sich beide leicht miteinander verbinden lassen. Vermutlich verläuft diese Reaktion über den bereits oben erwähnten I_a -Mechanismus.

Abschließend soll hier nicht unerwähnt bleiben, dass auch die Biomethylierung des Quecksilbers zwar ausgiebig betrachtet wurde (BENOIT ET AL. 2001; BENOIT ET AL. 1999 A UND B; THAYER 1995, HAMASAKI ET AL. 1995), hier aber nicht zum weiteren Verständnis beiträgt.

2.3.3 Biomethylierung von Bismut

In der Umwelt vorkommendes $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ wurde erstmals im Deponiegas (FELDMANN UND HIRNER 1995) und anschließend in anderen umweltrelevanten Matrices detektiert (MICHALKE ET AL. 2002; FELDMANN ET AL. 1999). Zudem wurde die Bildung von Monomethylbismut (MICHALKE ET AL. 2002; FELDMANN ET AL. 1999), Dimethylbismut und Bismuthin (MICHALKE ET AL. 2002) durch das methanogene *Methanobacterium formicicum* aus Bismutnitrat oder Bismut-haltigen Pharmazeutika beschrieben. Nach der Behandlung von Zellextrakten des *Methanobacterium formicicum* mit SAM konnte kein $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ nachgewiesen werden, während die Behandlung der Zellextrakte mit Methylcobalamin diese methylierte Spezies lieferte (MICHALKE ET AL. 2002). Ein *In-vitro*-Versuch, bei dem Methylcobalamin auf Bismutnitrat gegeben wurde, lieferte ebenfalls $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$.

Die Oxidation von Bismut(III) zu Bismut(V) bei der Methylierung innerhalb des Challenger-Mechanismus erscheint als nicht wahrscheinlich. Viel wahrscheinlicher ist hingegen der nicht oxidative Methyltransfer, bei dem Methylcobalamin als Methyl donor angenommen wird (MICHALKE ET AL. 2002).

Weiterhin wurde von MICHALKE ET AL. (2006) gezeigt, dass Octamethylcyclotetrasiloxan (OMCTS) die Umwandlung von Bismut durch *Methanosarcina barkeri*, einem repräsentativen Teil der Mikroflora des Klärschlammes, in das giftigere Trimethylbismut unterstützt. Vergleichende Studien mit den Ionophoren Monensin und Lasalocid, die ähnliche Effekte wie das OMCTS induzieren, zeigten, dass die Stimulierung der Bismut-Methylierung nicht für das Siloxan spezifisch ist. Die beobachtete Stimulierung deutet daher auf eine Unterstützung bei der Permeation des Metallions durch die Zellmembran hin.

Zudem konnte ein Gram-positiver Strang (ASI-1), welcher möglicherweise zur Spezies *Clostridium glycolium* gehört, identifiziert werden. Er stellt ca. 2 % der gesamten Mikroflora des Alluvialbodens dar und ist befähigt, Metall(oid)e zu volatilisieren (MEYER ET AL. 2007).

In einer Studie mit *ex situ* inkubierten Fäzesproben von 14 Probanden und Isolaten von Mausegmenten (Dünndarm, Blinddarm und Dickdarm) wurde gezeigt, dass diese zur Umwandlung von Metallen und Metalloiden befähigt sind. Die Annahme, dass die Darmmikroflora eine dominierende Rolle bei der Umwandlung hat, wird durch die Beobachtung gestützt, dass keimfreie Mäuse kein $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ produzierten (MICHALKE ET AL. 2008). Bismut unterscheidet sich von seinen Homologen Arsen und Antimon in der wesentlich geringeren Stabilität der Oxidationsstufe +V relativ zu der Oxidationsstufe +III. Bisher sind keine mono- oder dimethylierten Bismut(V)-Spezies bekannt. Das $(\text{CH}_3)_3\text{BiCl}_2$ zerfällt sehr schnell bei Raumtemperatur (WALLENHAUER UND SEPPELT 1994) und $(\text{CH}_3)_4\text{Bi}^+$ wurde ledig-

lich als Trifluormethylsulfonat isoliert (WALLENHAUER UND SEPPELT 1994). Weiterhin könnten sich transiente Methylbismut(V)-Zwischenstufen bei der Reaktion von Methylcobalamin mit Natriumbismutat gebildet haben (THAYER 1987).

2.4 Methoden zur Bismut-Analytik

Als Methoden zur Element- und Elementspeziesanalytik wurden innerhalb dieser Arbeit die GC/EI-MS, ICP-MS, GC/EI-MS/ICP-MS und LT-GC/ICP-MS verwendet. Hierbei wurde die Gesamtmetallbestimmung mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) durchgeführt. Elementspezies konnten nach gaschromatographischer Trennung entweder durch Elektronenstoßionisierung-Massenspektrometrie (EI-MS) oder simultan *via* GC/EI-MS/ICP-MS (KÖSTERS ET AL 2005) identifiziert werden. Zur Quantifizierung flüchtiger Bismut-organischer Spezies wurde die LT-GC/ICP-MS mit Interelement-Interaggregat-Kalibrierung (IHK, DIAZ-BONE 2006; FELDMANN 1997) angewendet. Nachfolgend sind die wesentlichen Grundlagen und Besonderheiten der analytischen Verfahren sowie der IHK dargestellt.

2.4.1 Gaschromatographie

2.4.1.1 Kenngrößen der Chromatographie

Alle chromatographische Verfahren basieren auf einer mehrfachen Wiederholung eines Trennprozesses wie z. B. der Verteilung der zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen in einer sowohl kontinuierlichen als auch dynamischen Weise. Daher kann die Chromatographie in einer Modellvorstellung als mehrfache Hintereinanderschaltung von Verteilungsgleichgewichten aufgefasst werden, die als wesentliche Voraussetzung die Gültigkeit des Nernst'schen Verteilungssatzes beinhaltet. Überträgt man das Prinzip des Verteilungssatzes auf die Chromatographie, so stellt der Trägergasstrom die erste Phase dar (mobile Phase) und der Kapillarfilm die zweite (stationäre Phase). Bevor man aber qualitativ und quantitativ auf Aussagen des Chromatogramms eingeht, sollten vorab die Kenngrößen anhand Abbildung 2-5 erläutert werden. Die *Totzeit* t_0 der Trennsäule ist hierbei die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule der *Länge* L zu wandern. Somit ist man auch in der Lage, die *Lineargeschwindigkeit* u des Lösungsmittels zu berechnen.

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (2-3)$$

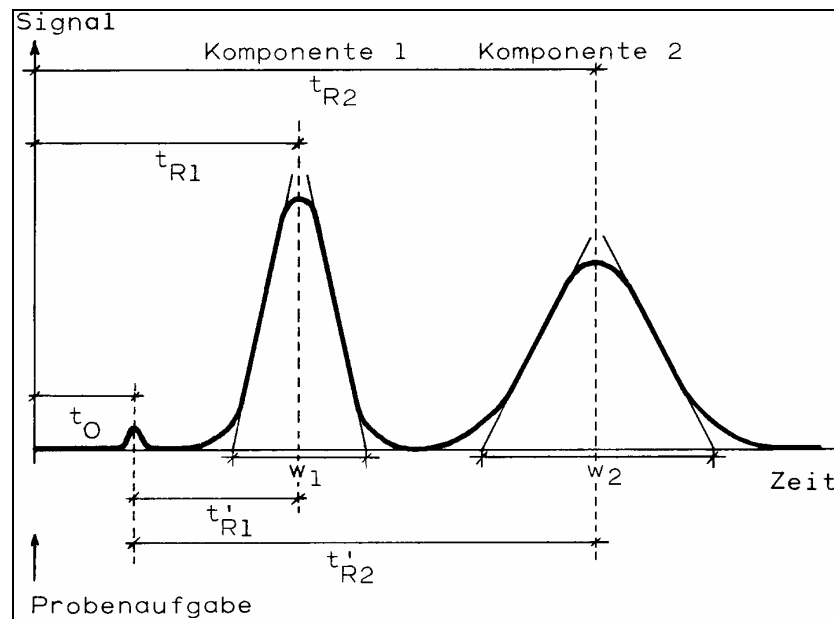


Abbildung 2-6: Kenngrößen eines Chromatogramms (HÜBSCHMANN 1996)

Die *Retentionszeit* t_R ist definiert als der Zeitraum, der zwischen dem Einspritzen einer Substanz bis zum Erreichen des zugehörigen Peakmaximums verstreicht. Die *Netto-Retentionszeit* t'_R einer Substanz ist die Differenz aus Retentions- und Totzeit oder anders formuliert:

$$t_R = t_0 + t'_R \quad (2-4)$$

Da die Retentionszeit unter gleichen chromatographischen Bedingungen stets konstant ist, kann sie als Identifizierungsmerkmal gegen einen Standard herangezogen werden (qualitative Aussage), wobei für eine eindeutige Identifizierung zusätzlich ein Massenspektrum erforderlich ist, da Fremdverbindungen koeluieren könnten.

2.4.1.2 Chromatographische Auflösung

Das Modell von der Theorie der Böden (MARTIN UND SYNGE 1941) basiert auf der Funktionsweise von Fraktionierkolonnen. Hierbei geht man davon aus, dass das Gleichgewicht zwischen zwei Phasen an jedem Boden der Kolonne eingestellt ist. Hieraus ergeben sich Möglichkeiten, aus dem Chromatogramm Beziehungen für die Trennschärfe und die Auflösung zu erhalten.

Teilt man die z. B. die chromatographische Säule in theoretische Böden auf, d. h. in Säulenstücke, die der Trennleistung eines Bodens entsprechen, so erhält man den so genannten *HETP-Wert* (engl. height equivalent to a theoretical plate). Dieser berechnet sich nach

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (2-5)$$

(L = Säulenlänge in mm, N = Anzahl theoretischer Trennstufen, Bodenzahl)

Die *Bodenzahl* N kann hierbei über die *Retentionszeit* t_R und die *Peak-Basisbreite* W berechnet werden.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2-6)$$

Aus den Gleichungen 2-5 und 2-6 kann man folgern, dass die Effektivität der Trennsäule mit steigender Bodenzahl zunimmt. Zur Beurteilung der Qualität einer chromatographischen Trennung wird die *Auflösung* R (engl. resolution) herangezogen. Sie ist definiert als

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_1 + W_2} \quad (2-7)$$

Unter der Annahme gleicher Peak-Basisbreiten kann Gleichung 2-7 zu

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W} \quad (2-8)$$

vereinfacht werden.

2.4.1.3 Die van Deemter-Funktion

Mit der Variation der *Lineargeschwindigkeit* u der mobilen Phase lässt sich die Effektivität eines Trennsystems wesentlich beeinflussen. Die van Deemter-Funktion (Gleichung 2-9) beschreibt hierbei den quantitativen Zusammenhang zwischen der *Bodenhöhe* H und der *Lineargeschwindigkeit* u der mobilen Phase.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2-9)$$

Hierin ist A die *Eddy-Diffusion*, B die *Longitudinaldiffusion* und C beschreibt die *Verzögerung des Stoffaustausches zwischen mobiler und stationärer Phase*. Das Produkt $C \cdot u$ wird als *Massentransfer- oder Massentransportterm* bezeichnet.

Die Eddy-Diffusion beschreibt den Einfluss der Packung in der Säule auf die Verbreiterung der Probenzone, allein durch die mechanischen Widerstände, die die Teilchen der Packung der mobilen Phase und damit den einzelnen Probenbestandteilen entgegensetzen. Die Analytmoleküle legen zwischen den Teilchen unterschiedlich lange Wegstrecken zurück, so dass sie auch schon ohne Wechselwirkungen mit der Teilchenoberfläche zu unterschiedlichen Zeiten aus der Säule austreten. Das bewirkt eine Peakverbreiterung. Die Eddy-Diffusion ist praktisch unabhängig von der Fließgeschwindigkeit und tritt eigentlich nur in gepackten Säulen auf und kann in der Kapillargaschromatographie vollständig vernachlässigt werden.

Die Longitudinaldiffusion wird durch den zweiten Term der van Deemter-Funktion beschrieben. Ursache hierfür ist die zufällige Bewegung der Moleküle in der mobilen Phase. Die longitudinale Komponente der Diffusion (in Richtung der Säulenachse) führt ebenfalls zu

einer Peakverbreiterung und ist proportional zur Aufenthaltszeit in der Säule und zum *Diffusionskoeffizienten* D . Da die Diffusionskoeffizienten in Gasen erheblich größer sind, ist der Beitrag der Longitudinaldiffusion in der GC, vor allem bei kleinen Trägergasgeschwindigkeiten, erheblich.

Der Einfluss des Massentransports auf die Peakbreite wird im *Massentransportterm* $C \cdot u$ beschrieben, der sich aus der Summe der Transportterme der einzelnen Phasen zusammensetzt.

$$C \cdot u = C_S \cdot u + C_M \cdot u \quad (2-10)$$

Hierin sind C_S und C_M die *Massentransferkoeffizienten der stationären und mobilen Phase*.

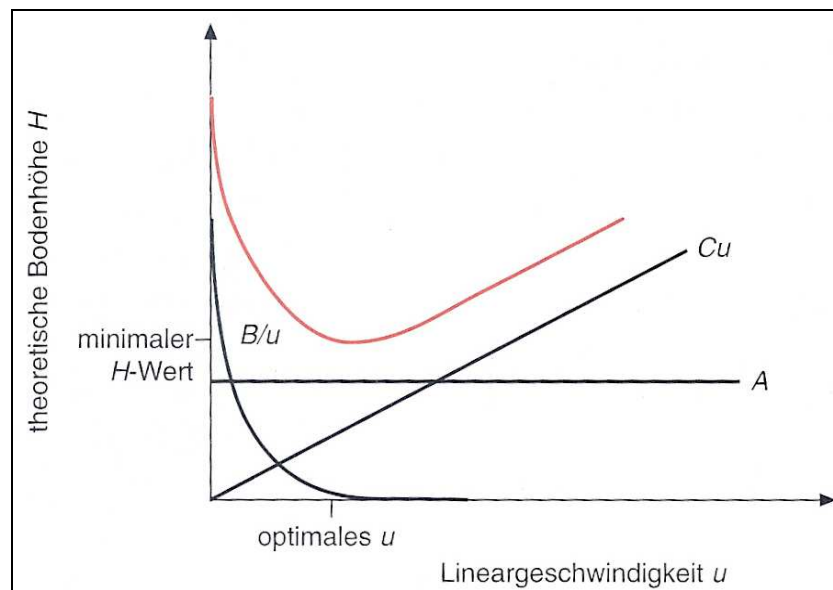


Abbildung 2-7: Beiträge der Eddy-Diffusion, der Longitudinaldiffusion und der Stoffaustauschverzögerung zum Kurvenverlauf der van Deemter-Funktion (rot, CAMMAN 2001)

Der Massentransportterm berücksichtigt, dass einige Teilchen vor Erreichen des Austauschgleichgewichtes in der Säule weitertransportiert werden. Die lineare Abhängigkeit des Massentransportterms von der *Lineargeschwindigkeit* u führt somit bei steigender Gasgeschwindigkeit zu einer breiteren Peakform.

Der qualitative Verlauf der van Deemter-Funktion mit seinen Einzelbeiträgen ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Man sieht, dass die *Bodenhöhe* H bei einer optimalen *Lineargeschwindigkeit* u einen minimalen Wert erreicht. An diesem Punkt hat ein gegebenes Trennsystem seine größte Effektivität, weshalb man stets versucht, die Geschwindigkeit der mobilen Phase auf das Minimum der van Deemter-Funktion einzustellen (CAMMAN 2001).

2.4.1.4 Beeinflussung der Auflösung

Formt man Gleichung 2-8 um, indem man den *Kapazitätsfaktor* $k' = (t_R - t_0)/t_0$, den *Selektivitätsfaktor* $\alpha = k'_2/k'_1$ und die *Trennstufenzahl* N einsetzt, so erhält man eine Grundgleichung, die für alle chromatographischen Elutionsverfahren wichtig ist.

$$R = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'} \cdot \sqrt{N} \quad (2-11)$$

In Gleichung 2-11 ist die Auflösung R direkt proportional zum Selektivitätsterm $(\alpha - 1)$, d. h. jede Vergrößerung des Verhältnisses der Verteilungskoeffizienten führt zu einer besseren Auflösung der Peaks (z. B. durch Wechseln der stationäre Phase). Die Auflösung ist zudem proportional zur Verweildauer einer Komponente in der stationären Phase bezogen auf die Gesamtretentionszeit. Dieser Zusammenhang ist mit dem *Retardationsterm* $k'/(1 + k')$ gegeben. Er sagt z. B. aus, dass keine Trennung stattfinden würde, wenn sich die Komponenten nur in einer Phase aufhalten würden ($k' = 0$).

Neben der Proportionalität zum Selektivitäts- und des Retardationsterms ist die Auflösung noch mit der Wurzel der *Bodenzahl* N proportional verknüpft. Hieraus folgt, dass die Auflösung nur mit der Wurzel der Säulenlänge ansteigt, da die Säulenlänge ebenfalls proportional mit der *Bodenzahl* N verknüpft ist. Somit bewirkt eine Verdopplung der Säulenlänge nur die 1,4-fache Auflösung.

2.4.1.5 Einstellung des Trägergasflusses

Nur bei optimal eingestelltem Trägergasfluss kann die maximale Trennleistung einer Kapillarsäule ausgenutzt werden. Die Trenneffizienz einer Kapillarsäule wird bei den chromatographischen Kenngrößen am Anfang dieses Kapitels in theoretischen Böden angegeben. Hieraus folgt, dass die Höhe der theoretischen Böden abnimmt. In den van Deemter-Kurven ist die Höhe der theoretischen Böden (HETP) in Abhängigkeit von der Lineargeschwindigkeit des Trägergases aufgetragen. Das Minimum der Kurve zeigt die optimale Einstellung für das Trägergas in der isothermen Betriebsweise an.

Bei Helium liegt der optimale Wert der Trägergas-Geschwindigkeit für Standardsäulen bei etwa 24 cm/s. Da die Viskosität des Trägergases im Verlauf eines Temperaturprogramms steigt, wird in der Praxis bei der niedrigeren Starttemperatur eine höhere Geschwindigkeit (ca. 30 cm/s) eingestellt. Zu hohe Werte vermindern die Effizienz.

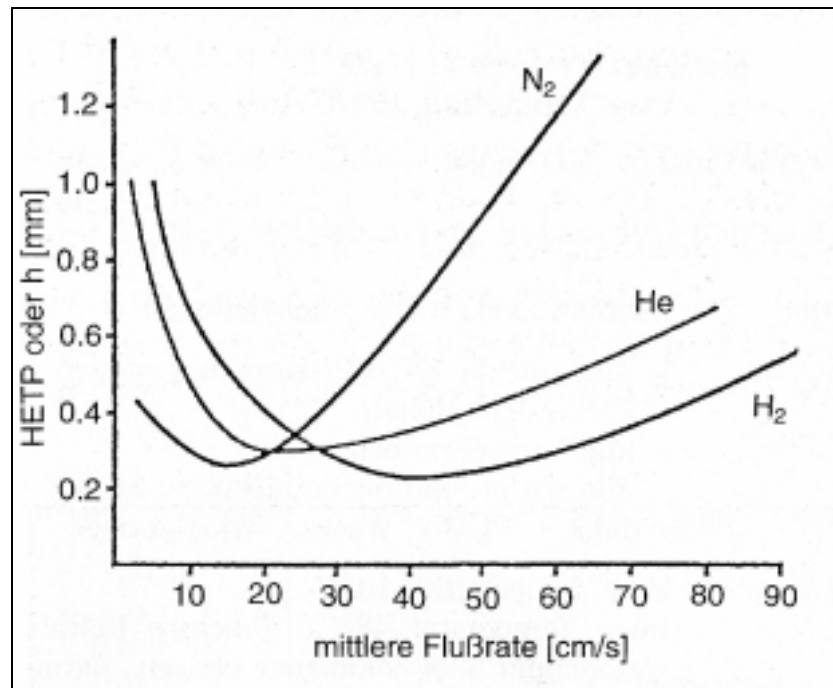


Abbildung 2-8: Van Deemter-Kurven für Stickstoff, Helium und Wasserstoff als Trägergas (Werte für eine Standardsäule mit 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser und 0,25 μm Filmdicke, HÜBSCHMANN 1996)

Weiterhin kann Helium durch Wasserstoff als Trägergas ausgetauscht werden. Die Vorteile des Wechsels liegen hierbei im geringeren Preis des Wasserstoffs und der höheren Chromatographiegeschwindigkeit bei gleicher Bodenhöhe. Zudem verläuft die van Deemter-Funktion flacher durch das Minimum (kleinste Bodenhöhe = optimale Trennleistung), wodurch Änderungen im Gasfluss erheblich geringere Auswirkungen auf die Bodenhöhe haben (Abbildung 2-8).

2.4.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie trennt die zu untersuchenden Stoffe nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis). Hierzu ist ein Hochvakuum nötig, da sonst weder eine bleibende Ionisierung noch ein ungestörter, fokussierbarer Ionenstrahl entstehen können. Die Massenspektrometer bestehen hierbei prinzipiell aus einer Ionisationseinheit, einem Einlasssystem für die Analyten in das Gerätevakuum, einem Massenfilter, welches nach dem m/z -Verhältnis auftrennt (hier Quadrupol) und einer Detektionseinheit zum Nachweis der Ionenmassen. Im Folgenden wird auf die aufgeführten Funktionseinheiten eines Massenspektrometers eingegangen.

2.4.2.1 Ionenquelle und Ionisation

Die Ionisationsausbeute ist eine wichtige Größe eines Massenspektrometers. Sie ist sowohl für die Empfindlichkeit und die Reproduzierbarkeit als auch für die Kalibrationsfähigkeit des MS wichtig. In der massenspektrometrischen Analyse müssen die Analytteilchen in positiv oder negativ geladene Ionen bzw. Radikationen überführt werden, damit sie in einem angelegten elektrischen Hochspannungsfeld beschleunigt werden können. Hierbei ergibt sich die Geschwindigkeit der Teilchen aus der kinetischen Energie, die sie durch Ionisation und Beschleunigung im elektrischen Feld aufnehmen. Für den induzierten Bindungsbruch von Molekülen oder zur Ionisation von Molekülfragmenten oder Elementen kann man die kinetische Energie von Elektronen, Ionen, Molekülen, Photonen sowie thermische oder elektrische Energie verwenden. Das führt dazu, dass heute fast jede Verbindung für die massenspektrometrische Detektion ionisierbar ist. Nachfolgend werden die Prinzipien der Elektronenstoßionisation und des induktiv gekoppelten Plasmas erläutert, welche während der Arbeit ausschließlich verwendet wurden.

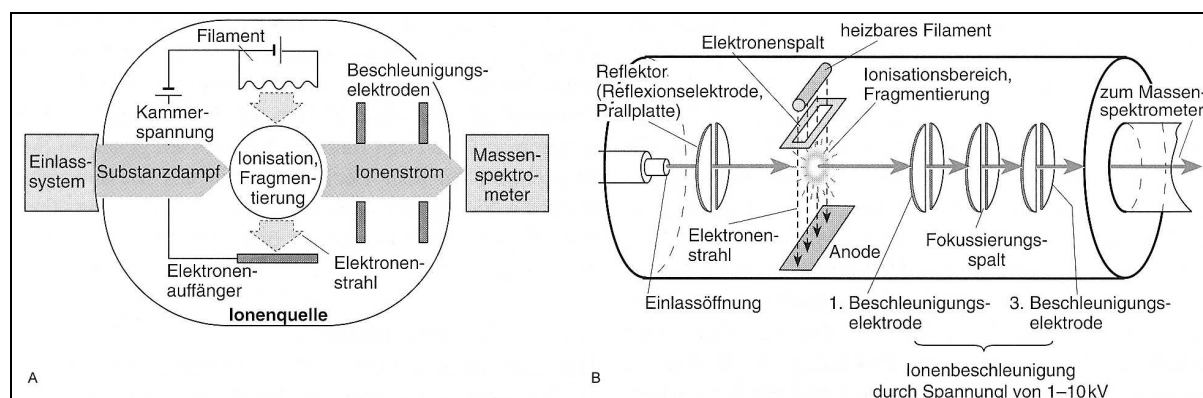


Abbildung 2-9: Prinzip (A) und Aufbau (B) der Elektronenstoßionisation (CAMMAN 2001)

Die Elektronenstoßionisation (engl. electron impact, EI) basiert auf dem Prinzip, dass die in die Ionenquelle verdampften Analytteilchen von einem Strahl thermischer Elektronen mit einer Energie von 70-100 eV beschossen werden. Die Elektronen werden hierbei aus einer Glühkathode (Wolfram- oder Rheniumdraht) emittiert, und durch eine Spannung von 70-100 V beschleunigt, die zwischen dem Heizdraht und einer gegenüberliegenden Anode anliegt. Hierbei treffen die Elektronen senkrecht auf den Molekülstrahl und bilden durch diese Stoßionisation hauptsächlich Radikalkationen $M^{+\bullet}$.



Die gebildeten Kationen werden durch ein angelegtes elektrisches Feld im Kilovolt-Bereich in die Flugrichtung des Molekülstrahls beschleunigt und mit einer Ionenoptik auf den Eintrittsspalt des Massenseparationssystems fokussiert. Dies geschieht durch elektrostatische

Blenden, welche im Prinzip voneinander isolierte Metallplatten mit zentraler Öffnung sind, die auf verschiedenen Potentialen gehalten werden können. Die EI wird mit ihren meist verwendeten 70 eV den harten Ionisationstechniken zugeordnet. Dies bedeutet, dass generell Energie im Überschuss an die zunächst gebildeten einfach geladenen Molekülionen abgegeben wird. Die dabei entstehenden stark angeregten Schwingungs- und Rotationszustände der gebildeten Molekülionen relaxieren unter zahlreichen Bindungsbrüchen, wobei auch Stöße mit anderen Partikeln eine Rolle spielen. Die maximale Anzahl von Tochterionen, die durch Elektronenbeschuss erzeugt werden, wird bei einer Elektronenenergie von ca. 70 eV erzielt. Hierbei ist das Verhältnis von unveränderten zu ionisierten Molekülen ca. 100:1 (GROSS 2004).

Von Vorteil ist bei der EI die einfache Anwendung und der hohe Ionenstrom. Nachteilig wirkt sich oftmals das fehlende Molekül- bzw. Mutterion aus, welches der relativen Molekülmasse der Verbindung entspricht. Ebenfalls als Nachteil gilt die Beschränkung auf flüchtige Analyten mit Molmassen kleiner als 1000 u.

Im induktiv gekoppelten Plasma hingegen wird der Analyt bei ca. 7000 °C atomisiert und ionisiert. Zur Plasmaerzeugung wird das Plasmagas (hier Argon) durch eine Quarztorch, welche aus drei konzentrischen Quarzrohren besteht, geleitet. Während im inneren Rohr der Eintrag des Analyten in Form eines Aerosols erfolgt, wird das mittlere Rohr von einem Hilfsgas durchströmt. Das Kühlgas durchströmt das äußere Quarzrohr, dessen Ende von einer Induktionsspule umgeben ist. Die im Bereich der Induktionsspule befindlichen Argonatome können durch ein angelegtes Wechselfeld mittels einer Initialzündung in ein Plasma überführt werden. Das entstandene Plasma brennt anschließend ringförmig und mitgeführtes Probenaaerosol kann axial ins Plasma eindringen. Im Plasmakern werden ca. 7000 °C erreicht, welche in Verbindung mit einer hohen Verweilzeit der Probe zu einer effektiven Energieübertragung auf die eingebrachten Probenbestandteile führt. Somit können die für die weiteren analytischen Bestimmungen notwendigen Prozesse der Atomisierung und Ionisierung in einer extrem energiereichen Argonatmosphäre durchgeführt werden, sodass auch refraktäre Elemente, die in Verbindung mit feuchten Aerosolen zur Bildung schwer zersetzbarer Oxide neigen, atomisiert werden.

2.4.2.2 Das Einlasssystem

Bei der GC/MS findet ein direkter Gaseinlass zur Kopplung der GC mit der MS statt. Hierbei muss besonders auf die vollständige Erfassung der zeitabhängigen Elutionssignale durch das Massenspektrometer geachtet werden.

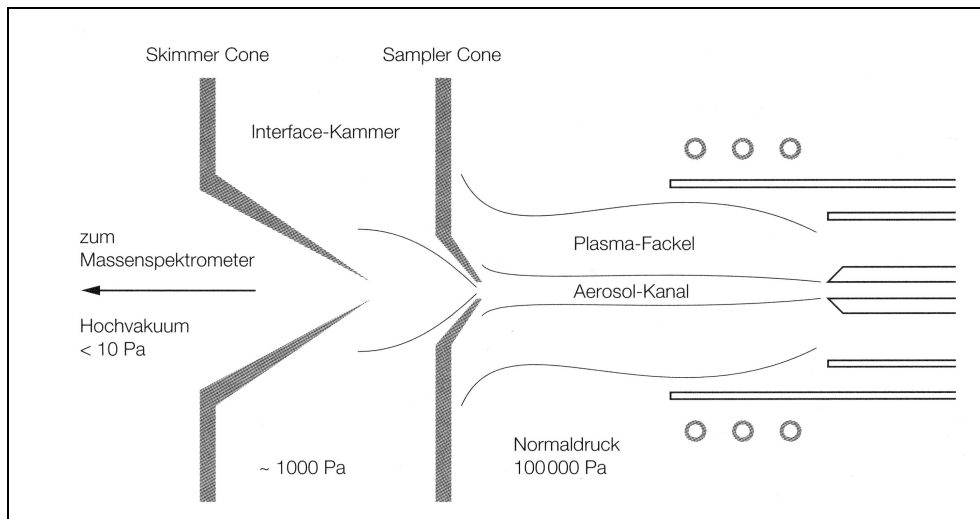


Abbildung 2-10: Interface bei einem ICP-MS (KLÄNTSCHI ET AL. 1996)

Ein eluierender GC-Peak ist normalerweise ca. 2-5 s breit, die der Computer des Massenspektrometers ausreichend schnell digitalisieren muss, um eine unverfälschte Peakform speichern zu können.

Für die GC/MS-Kopplung werden meist Dünnschichtkapillarsäulen mit Gasflüssen von 1-2 ml/min verwendet. Die thermostatisierbare Säule der GC wird über ein kurzes, ebenfalls beheizbares Interface direkt an die Ionenquelle des Massenspektrometers angeschlossen, so dass die aus der GC eluierenden Komponenten on-line im Massenspektrometer ionisiert werden.

Bei der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie wird das in Abbildung 2-10 dargestellte Interface zwischen Plasmafackel und Massenspektrometer verwendet. Hierbei wird ein Teil des Plasmas durch eine oftmals aus Nickel gefertigte Blende (Sampler, Durchmesser ca. 1 mm) in den Bereich des Vorvakuums gesaugt. Im Vorvakuum beträgt der Druck ca. 1 Torr, welcher durch eine Pumpe aufrecht erhalten wird. Um einen maximalen Ionentransfer aus dem Plasma zu gewährleisten, wird der Sampler auf das Plasmazentrum ausgerichtet. Da das Plasma unmittelbar auf den Sampler aufsetzt, wird dieser durch eine Wasserkühlung in der Samplerhalterung gekühlt.

In einem Abstand von ungefähr einem Zentimeter hinter dem Sampler befindet sich eine weitere Nickelblende (Skimmer). Der Bereich hinter dem Skimmer wird durch die Hochvakuumpumpe bei einem Druck von ca. $2 \cdot 10^{-5}$ Torr gehalten. Durch das Druckgefälle am Skimmer wird der Ionenstrahl in den Bereich des Massenspektrometers hineingezogen. Die beiden Vakuum-Pumpen sorgen dafür, dass sich in diesem Bereich praktisch keine Neutralteilchen befinden. Im Gegensatz zu den schweren Ionen, die eine Energie von etwa 2-10 eV haben, werden die wesentlich leichteren Elektronen durch die geerdeten Blenden und die po-

sitiv geladene Ionenoptik abgeführt. In den meisten Quadrupol-ICP-MS-Geräten befindet sich kurz hinter dem Skimmer eine Metallblende (Stopblende), die das durch Sampler und Skimmer einfallende Licht ausblendet. Bei der 'off-axis'-Methode wird der Ionenstrahl abgelenkt, so daß kein Licht auf den Detektor fallen kann. Der Ionenstrahl wird nun durch ein Linsensystem fokussiert und gelangt dann in den Massenfilter. Von den ursprünglich im Plasma gebildeten Ionen erreicht weniger als 1 % diesen Punkt.

2.4.2.3 Trennsysteme in der Massenspektrometrie

Die Massenauftrennung in einem Massenspektrometer kann im Allgemeinen nach sechs Prinzipien stattfinden: Die Magnet- und Sektorfeld-Trennung, der Quadrupolmassenfilter, die Ionenfalle, die Registrierung der Umlauffrequenz von Ionen in einer Ionencyclotronresonanz-Zelle, die Bestimmung einer Flug- oder Driftzeit und ein Massenbeschleuniger.

Hierbei lässt sich die Massentrennung mittels Quadrupolmassenfilter, Ionenfalle und Ionencyclotronresonanz auf das gleiche physikalische Massenfilterprinzip, zu dem auch die Massentrennung mittels Monopol gehört, zurückführen. Im weiteren Verlauf wird dieses Prinzip am Quadrupolmassenfilter erläutert, welcher in der Arbeit ausschließlich Verwendung fand.

Der Quadrupolfilter (Abbildung 2-11) besteht aus vier konzentrisch parallel zueinander angeordneten Stabelektroden, die gegenüberliegend paarweise an eine variable jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle angeschlossen sind. Zudem wird eine modulierbare Hochspannungsfrequenz mit dem Effekt überlagert, dass nur Ionen gleicher Masse auf bestimmten stabilen Wellenbahnen beim Passieren der Stabelektroden den eigentlichen Massendetektor erreichen. Hierbei lässt sich die Ionenbewegung durch das elektromagnetische Quadrupolfeld mit

$$\frac{m}{z} = \frac{5,7 \cdot V}{\omega^2 \cdot r^2} \quad (2-13)$$

abschätzen. Hierin ist m die *Ionenmasse*, z die *Ladungszahl*, V die *Wechselspannung*, ω die *Kreisfrequenz* und r der *Quadrupolradius*.

In der Praxis führt ein Wechsel der angelegten Spannungen zum schnellen Massenscan (ca. 10-200 ms) über ein jeweils gegebenes m/z -Verhältnis, wobei höhere Verweilzeiten pro Masse zu erhöhten Signalen führen. Weitere Vorteile des Quadrupolmassenfilters sind die hohe dynamische Empfindlichkeit für den Ionenstrom von bis zu sieben Größenordnungen und die Möglichkeit bei relativ hohen Drücken von ca. $3 \cdot 10^{-3}$ - $7 \cdot 10^{-2}$ Pa zu arbeiten. Für den Nutzer sind normalerweise der Massenbereich und die maximal erzielbare Auflösung die wichtigsten Parameter eines Quadrupolmassenspektrometers. Während der Massenbereich von den Parametern Durchmesser des Stabsystems (1-19 mm) und maximale Wechselspan-

nung bestimmt wird, ist die maximale Auflösung von der Länge des Stabsystems, der Ionene-
nergie bei der Injektion und Hochfrequenzspannung abhängig. Hiernach erhält man für die
Auflösung eines Quadrupolmassenspektrometers:

$$R = \frac{\bar{m}}{\Delta m} = 0,05 \left(f \cdot L \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot V_z}} \right)^2 \quad (2-14)$$

(f = Hochfrequenz, L = Länge des Massenfilters, V_z = Ionenenergie)

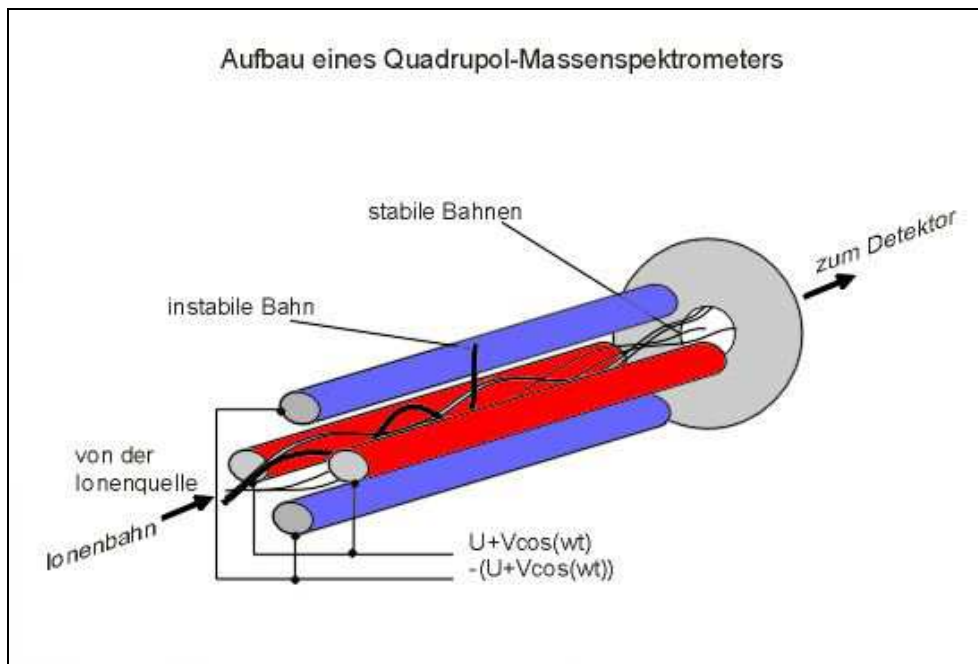


Abbildung 2-11: Schema eines Quadrupolmassenfilters mit stabilen und instabilen Ionenbahnen

Die Energie der transmittierten Ionen liegt im Bereich von 5 eV. Es ergibt sich, dass die Auswahl des Massenbereichs die Auflösung über den kompletten Massenbereich limitiert. Vielfach werden Quadrupolmassenfilter mit Einheitsauflösung eingesetzt. Einheitsauflösung bedeutet, dass eine Masse m noch von der nachfolgenden Masse $m+1$ getrennt wird ($\Delta m = 1$). Die Auflösung eines Quadrupolmassenfilters kann durch die Variation des Verhältnisses von Gleich- und Wechselspannung verändert werden. Hierbei bewirkt eine Erhöhung der Auflösung eine Verringerung der effektiven Eintrittsöffnung, also des detektierbaren Ionenstroms. Die maximal zu erhaltene Auflösung ist somit von der Masse abhängig und steigt mit zunehmender Massenzahl.

2.4.2.4 Die Detektionseinheit

Die Detektoren in der Massenspektrometrie wandeln den nach dem m/z -Verhältnis aufgetrennten Ionenstrom in einen elektrisch messbaren Strom, dem Messsignal, um. Hierbei erforder-

dern LC- und GC-Kopplungen an das Massenspektrometer Detektoren, die schnell aufeinander folgende Signale registrieren. Diese Schnelligkeit wird u. a. von Faraday-Detektoren, Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) und Kanalelektronenvervielfacher (Channel Electron Multiplier, CEM) erfüllt.

Beim Faraday-Detektor handelt es sich um einen einseitig offenen Edelstahlbecher mit der Abmessung von ca. 2 x 4 x 4 mm, der über einen Hochohmwiderstand an Masse gelegt ist. Über diesen Widerstand fließen die Ionenladungen ab. Bei Kationen fließen die Elektronen von der Gerätemasse in den Becher und neutralisieren die Ionen. Dabei entsteht für die Dauer des Ioneneinfangs nach dem Ohm'schen Gesetz über besagten Widerstand ein messbarer Spannungsabfall. Die Vorteile des Faraday-Detektors sind geringe Kosten und eine lange Lebensdauer bei zugleich hoher Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit. Im Gegensatz zu einem SEV zeigt er keine Massendiskriminierung.

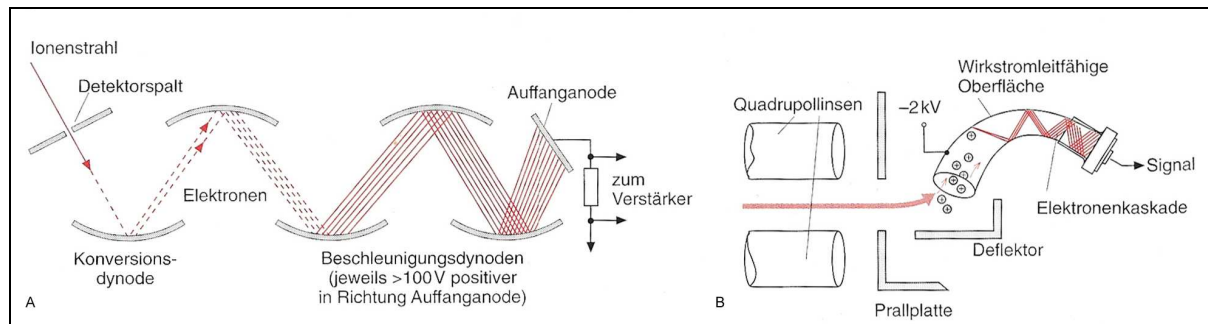


Abbildung 2-12: SEV mit diskreten Dynoden (A) und CEM mit kontinuierlicher Dynode (B) (CAMMAN 2001)

Der Sekundärelektronenvervielfacher funktioniert ähnlich wie ein optischer Photomultiplier. Ein einzelnes Ion, welches auf die erste Konversionsdynode des SEV trifft, erzeugt zwei bis drei Elektronen, die in einer nachgeschalteten diskreten Dynodenkaskade eine Elektronenlawine auslösen. Die hierbei erzielbaren Verstärkungen liegen im Bereich von 10^5 bis 10^8 . Die Nachweisgrenze des SEV beträgt 10^{-17} - 10^{-18} A und entspricht 6 Ionen/s. Der Vorteil des SEV liegt in seinen kurzen Ansprechzeiten, weshalb er auch in gängigen Bench-Top Geräten zu finden ist. Nachteilig sind seine begrenzte Lebensdauer, da die detektierten Ionen als Neutralteilchen auf der Oberfläche der Konversionsdynode liegen bleiben und dort die Elektronenaustrittsarbeit beeinflussen, der im Vergleich hohe Preis, ein maximal tolerierbarer Gasdruck von 10^{-4} Pa, da sonst die Elektronen nicht im geforderten Maße beschleunigt werden können und eine Massenabhängigkeit bei der Konversion in Elektronen.

Die letzte hier aufgeführte Detektionseinheit ist der Kanalelektronenvervielfacher, der inzwischen die weiteste Verbreitung in der Massenspektrometrie besitzt. Der CEM befindet sich im Hochvakuumteil des Massenspektrometers und besteht aus einem nach innen offenen, sich

verjüngendem Glas- oder Keramikröhrchen von ca. 70 mm Länge und 1 mm innerem Durchmesser, welches mit einer Cu/Be-Widerstandsschicht bzw. mit einem speziellen Pb-Silikatglas beschichtet ist. Hierbei erhält man eine kontinuierliche Dynode mit hoher Verstärkung. An den CEM wird eine Hochspannung von etwa -3 bis maximal -10 kV so angelegt, dass die eintretenden Ionen bei ihrem Weg durch den Detektor eine Elektronenlawine freisetzen, welche nach Verstärkung das Messsignal darstellt.

Vorteil des CEM ist sein geringes Signal/Rausch-Verhältnis, während die geringe Lebensdauer, die von der Anzahl registrierter Pulse abhängt, nachteilig ist. Das Verstärkungsverhältnis liegt bei 10^6 - 10^8 und ist im Mittel ein wenig höher als beim SEV.

2.4.3 Kopplungstechniken zur Elementspeziierung

Während der letzten ca. 15 Jahre wurden viele Kopplungstechniken entwickelt, die die effiziente chromatographische Trennung *via* Gas-, Flüssigkeits- oder überkritischer Fluidchromatographie sowie der Kapillarelektrophorese mit sensitiven Multielementtechniken wie z. B. der ICP-MS oder Monoelementtechniken wie der Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder der Atomfluoreszenzspektroskopie (AFS) verbinden. Diese Techniken wurden anschließend sowohl zur Untersuchung verschiedener umweltrelevanter Matrices wie Wasser und Sedimenten als auch von Organismen, biologischen Proben und Geweben verwendet (LOBINSKI 1998; ZOOROB ET AL. 1998; KOCH ET AL. 1998; SUTTON ET AL. 1997; LE ET AL. 1996; SZPUNAR-LOBINSKA ET AL. 1995).

Für die Analytik gasförmiger Analyten, auf die sich diese Arbeit beschränkte, basieren viele Techniken auf dem Kryotrapping mit anschließender Refokussierung und gaschromatographischer Trennung. Die Trennung von Organometall(oid)spezies kann hierbei mittels gepackter Säulen und AAS und AFS als Monoelement- und *via* ICP-MS als Multidetektionsmethode durchgeführt werden (GRÜTER ET AL. 2000, MARTIN UND DONARD 1995, FELDMANN UND HIRNER 1995, FELDMANN ET AL. 1994). Alkylierte Metall(oid)e können auch auf Kapillarsäulen getrennt und anschließend durch Atomemissionsspektrometrie (AES) oder ICP-MS detektiert werden (FERNANDEZ ET AL. 2000; AMOUROUX ET AL. 1998; TAO ET AL. 1998; CEULEMANS UND ADAMS 1996; PRANGE UND JANTZEN 1995). Durch verbesserte Zeitauflösung und die Option zur Messung von Isotopenverhältnissen fand zudem die Kopplung von Gaschromatographie und Flugzeitmassenspektrometrie Einzug in die Speziierung (FELDMANN ET AL. 2001). Zudem entwickelten KÖSTERS ET AL. (2005) die simultane Detektion mittels EI-MS und ICP-MS nach gaschromatographischer Trennung und ermöglichen somit den gleichzeitigen Erhalt von Element- und Strukturinformation.

Für die weiteren Kopplungstechniken im Bereich der bereits oben aufgeführten Separationsmethoden sei auf die Übersichtsartikel von HIRNER (2006) und von DOPP ET AL. (2004) verwiesen.

2.4.4 Interelement-Interaggregat-Kalibrierung

Zur Quantifizierung der in der Massenspektrometrie basierten Elementspeziationsanalyse stehen im Wesentlichen fünf Relativmethoden zur Verfügung. Neben der internen und der externen Standardisierung, der Standardadditionsmethode und der Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS) (HEUMANN 2003) steht die von FELDMANN (1997) entwickelte und von DIAZ-BONE (2006) weiter ausgebaut und in dieser Arbeit verwendete Interelement-Interaggregat-Kalibrierung (IIK) als eigenständiger Spezialfall der internen Standardisierung zur Verfügung.

Die IIK basiert auf der Annahme, dass sich durch die unterschiedliche Ionenbildung im Plasma und den Ionentransfer in das Interface eine für jedes Element spezifische Ionenausbeute ergibt, welche die Signalempfindlichkeit beeinflusst.

Aufgrund der unterschiedlichen Signalempfindlichkeiten von Analyt und Standardionen muss daher ein relativer Umrechnungsfaktor berücksichtigt werden. Dieser relative Empfindlichkeitsfaktor (RSF) wird mittels einer Standardlösung, welche sowohl die Kalibrierionen als auch die Standardionen der zu analysierenden Elemente enthält, bestimmt.

Die größten Probleme hierbei entstehen durch die Tagesdrift der ICP-MS und den daraus resultierenden veränderten Bedingungen bei der Vermessung der Proben und des RSF.

Da die Analytmenge bei der Kalibrierung auf die Menge der Standardionen bezogen wird, muss die absolute Menge der in das Plasma injizierten Standardionen bekannt sein. Bei den gasförmigen Proben kann von einer nahezu vollständigen Überführung ausgegangen werden. Diese Annahme gilt aber nicht für die verwendete wässrige Metallionenlösung (10 ppb in 1 % HNO_3), da nur ein Bruchteil der angesaugten Lösung (ca. 11-12 %) zerstäubt wird, und nach der Aerosolklassierung durch die Sprühkammer in das Plasma gelangt. Der interne Standard (IS) wird während der gesamten Messung mittels des hier verwendeten Microflow-Zerstäubers in ein feuchtes Aerosol überführt und dem Argonplasma kontinuierlich zugeführt. Die Bestimmung der Zerstäuberflussrate und der Zerstäubereffizienz erfolgt über eine Differenzwägung der Standardlösung und des Ablaufes (Waste) der Sprühkammer.

Der RSF berechnet sich aus dem Verhältnis der Zählrate (Impulse pro Sekunde) der Analytelemente und der verwendeten Kalibrierionen mittels folgender Gleichung:

$$\text{RSF}_a = \frac{I_a \cdot c_{\text{TI}}}{I_{\text{TI}} \cdot c_a} \quad (2-15)$$

(RSF_a = Relativer Empfindlichkeitsfaktor, I_a = Blindwert-korrigierte Intensität des Analytsignals, I_{Tl} = Intensität des ^{205}Tl -Signals in der Multielement-Standardlösung, c_a bzw. c_{Tl} = Konzentration des Analyten bzw. des ^{205}Tl in der Multielement-Standardlösung ($\mu\text{g/kg}$))

Die absolute Menge des Analyten m_a wird nach Subtraktion der Grundintensität durch Integration des Intensitätssignals über die Zeit nach folgender Formel (FELDMANN ET AL. 1997) berechnet:

$$m_a = \int_{t_1}^{t_2} \frac{I_a}{I_{Tl}} \cdot \frac{v \cdot z \cdot c_{Tl}}{RSF_a} \cdot dt \quad (2-16)$$

(m_a = absolute Menge des Analyten in ng, t = Zeit in s, t_1 = Peakbeginn in s, t_2 = Peakende in s, I_a = Intensität des Analytsignals, I_{Tl} = Intensität des ^{205}Tl -Signals, v = Fluss der ^{205}Tl -Standardlösung in ml/s, z = Zerstäubereffizienz in %, RSF_a = Relativer Standardfaktor des Analyten, c_{Tl} = Konzentration des Thalliums in der ^{205}Tl -Standardlösung in ($\mu\text{g/kg}$)).

3 Instrumenteller Teil

3.1 Gase, Chemikalien und Laborzubehör

Nachfolgend sind die verwendeten Gase, Chemikalien, Referenzmaterialien, Standards und das weitere Laborzubehör tabellarisch dargestellt.

Tabelle 3-1: Eingesetzte Gase

Gas	Reinheit	Hersteller
Argon	4.6	Air liquide, Düsseldorf
Helium	5.0	Air liquide, Düsseldorf
Kohlendioxid	technisch, 99,7 Vol. %	Air liquide, Düsseldorf

Tabelle 3-2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien-Bezeichnung	Reinheit/Konzentration	Hersteller
Ammoniaklösung	25 %	AppliChem, Darmstadt
Bismutcitrat	> 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
De-Noltab®	Wirkstoff: Bismutsubcitrat, 107,5 mg Bi pro Tablette	Yamanouchi Pharma Ltd., Surrey, Großbritannien
Entschäumer	Antifoam 289	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	technisch	Chemikalienlager der Universität Duisburg-Essen
Hexan	Suprasolv®	Merck, Darmstadt
Interner Standard-Stammlösung für die IIK	1 ppm: Ga, Y, Rb, Rh, Cs, Ce, Tl; 10 ppm: In	siehe Tabelle 3-3
Kaliumhydroxid	TraceSelect, ≥ 65 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumtetraethylborat	98 %	Galab, Geesthacht
RSF-Stammlösung für die IIK	1 ppm: Ge, Sn, Sb, Te, Hg, Pb, Bi, Ga, Y, Rb, Rh, Cs, Ce, Tl; 10 ppm: In, As, Se	siehe Tabelle 3-3
Salpetersäure	65 %	Fisher Scientific, Leicester- shire, Großbritannien
Salzsäure	30 %, Suprapur®	Merck, Darmstadt
Stickstoff	flüssig	Praxair, Düsseldorf
Wasserstoffperoxid	30 %, Suprapur®	Merck, Darmstadt

Tabelle 3-2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung)

Chemikalien-Bezeichnung	Reinheit/Konzentration	Hersteller
Bismut(III)chlorid	wasserfrei, 99,9 %	Alfa Aesar, Karlsruhe
Glutathion	> 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Cystein	> 98 %	Fluka, Buchs, Schweiz

Tabelle 3-3: Standards und Referenzmaterialien

Standard oder Referenzmaterial	Bezeichnung / Zusammensetzung	Hersteller
Antimon ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Antimon als Sb ₂ O ₃ in 7 % HCl	Merck, Darmstadt
Arsen ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Arsen als H ₃ AsO ₄ in 2-3 % HNO ₃	Merck, Darmstadt
Bismut ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Bismut als Bi(NO ₃) ₃ in 2-3 % HNO ₃	Merck, Darmstadt
Cäsium Plasma-Standardlösung	Specpure [®] , 1 mg/ml Cäsium als Cs ₂ CO ₃ in 5 % HNO ₃	Alfa Aesar, Karlsruhe
Cer AAS-Standardlösung	1 mg/ml Cer in 2 % HNO ₃	Acros Organics, Geel, Belgien
Gallium AAS-Standardlösung	1 mg/ml Gallium in 2 % HNO ₃	Acros Organics, Geel, Belgien
Germanium ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Germanium als (NH ₄) ₂ GeF ₆ in H ₂ O	Merck, Darmstadt
Holmium AAS-Standardlösung	1 mg/ml Holmium in 2 % HNO ₃	Acros Organics, Geel, Belgien
Multielement-Standardlösung	0,01 mg/l Lithium, Yttrium, Cer, Thallium und Kobalt in 2 % HNO ₃	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Indium AAS-Standardlösung	1 mg/ml Indium in 2 % HNO ₃	Acros Organics, Geel, Belgien
Quecksilber Plasma-Standardlösung	Specpure [®] , 1 mg/ml Quecksilber in 5 % HNO ₃	Alfa Aesar, Karlsruhe
Referenzmaterial	Seronorm [™] , Trace Elements in Whole Blood	SERO AS, Billingstad, Norwegen
Referenzmaterial	Seronorm [™] , Trace Elements in Urine, Level 1 und 2	SERO AS, Billingstad, Norwegen
Rhodium ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Rhodium als Rh(NO ₃) ₃ in 2-3 % HNO ₃	Merck, Darmstadt
Rubidium ICP-/AAS-Standardlösung	1 mg/ml Rubidium als Rb ₂ CO ₃ in 0,5 mol/l HNO ₃	Bernd Kraft GmbH, Duisburg

Tabelle 3-3: Standards und Referenzmaterialien (Fortsetzung)

Standard oder Referenzmaterial	Bezeichnung / Zusammensetzung	Hersteller
Selen ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Selen als SeO ₂ in 2-3 % HNO ₃	Merck, Darmstadt
Tellur ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Tellur als H ₆ TeO ₆ in 2-3 % HNO ₃	Merck, Darmstadt
Thallium Plasma-Standardlösung	Specpure [®] , 1 mg/ml Thallium in 5 % HNO ₃	Alfa Aesar, Karlsruhe
Trimethylbismut		VeZerf Laborsynthesen, Idar-Oberstein
Yttrium ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Yttrium als Y(NO ₃) ₃ in 2-3 % HNO ₃	Merck, Darmstadt
Zinn ICP-MS-Standard	Certipur [®] , 1 mg/ml Zinn als SnCl ₄ in 7 % HCl	Merck, Darmstadt

Tabelle 3-4: Laborzubehör im Institut für Umweltanalytik

Bezeichnung	Modell/Ausführung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius CP 324S	Sartorius AG, Göttingen
Ausdampfapparatur	ADA-1	Maassen GmbH, Reutlingen
Bördeklappen	diverse Größen	CS-Chromatographie, Langerwehe
Chromatographiesäule	Borosilikatglas, Länge 80 cm, A.D. 8 mm, I.D. 5 mm	Glaswerkstatt der Universität Duisburg-Essen
Cleanbench	Biowizard, KOJAIR [®]	KojairTech Oy, Finnland
Dewar	zylindrisch, Modell 1 C, 300 ml	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Dewar	zylindrisch, Modell 13 C, 2000 ml	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Digitales Einstichthermometer	DET1R	Conrad Elektronik, Essen
Dreihalskolben	100 ml, Sonderanfertigung	Glaswerkstatt der Universität Duisburg-Essen
Einmal-Injektions-Kanülen	Sterican [®] , diverse Größen	Braun, Melsungen
Eismaschine	Scotsman [®] , AF-10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, U.S.A.
Filteranlage	Seralpur pro 90 CN	Elga-Seral, Ransbach-Baumbach

Tabelle 3-4: Laborzubehör im Institut für Umweltanalytik (Fortsetzung)

Bezeichnung	Modell / Ausführung	Hersteller
Gasuhr	Trommel-Gaszähler TG 1/6	Ritter Apparatebau, Bochum
Gefrierschrank	-80 °C, Hera freeze, HFU 686 Basic	Kendra, Langenselbold
Kryomühle	Freezer Mill 6850	Spex CertiPrep, Metuchen, U.S.A.
Kühlfalle	Borosilikatglas, Länge 20 cm, AD 8 mm, ID 5 mm	Glaswerkstatt der Universität Duisburg-Essen
Leak Detective II™		Restek, Bad Soden
Messkolben	diverse Volumina	Hirschmann Laborgeräte®, Eberstadt
Mikrowellen- Druckaufschlusssystem	MARS 5	CEM, Kamp-Lintfort
Mikroliterspritze	10 µl, MS*R10	Ito Corporation, Fuji, Japan
pH-Teststreifen	Alkalit®, pH 7,5-14	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	diverse Größen	VWR, Langenfeld
Power Supply	Typ 3252,1	Statron, Fürstenwalde
Quarz-Subbolinganlage		Maasen GmbH, Reutlingen
Reinstwasseranlage	Purelab ultra	ELGA Labwater, Celle
Rotameter (GC)	0-150 mm	Brooks Instruments, Elmshorn
Rotameter (Purge)	0-150 mm	Supelco, Bellefonte, U.S.A.
S-Monovette®	3 und 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht- Rommelsdorf
Säulenfüllung	10 % SP-2100 auf Supelcoport	Supelco, Bellefonte, U.S.A.
Seifenblasenzähler	100 ml, 1-10-100 ml	Hewlett-Packard, Palo Alto, U.S.A.
Septen	Butyl-Teflon®-Kautschuk, diverse Größen	CS-Chromatographie, Langerwehe
Spritzen	5 ml, BD Discardit™ II	Becton & Dickinson, Heidelberg
Tedlar® Gas Sampling Bags	10 l	Supelco, Taufkirchen
PFA-Gefäße	XP 1500 plus	CEM, Kamp-Lintfort
Trennstelltransformator	LTS 606	Thalheimer Transformator- enwerke, Thalheim
Trockenschrank	Function line	Heraeus, Langenselbold
Vakuumpumpe		Oehmen Labortechnik, Essen

Tabelle 3-5: Nährmedien und Zelllinie der Zellversuche

Chemikalien-Bezeichnung	Reinheit/Konzentration	Hersteller
D-PBS	Gibco [®] , steril, 1x, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Invitrogen [™] , Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco [®] , steril, Chargen- nummer: 41A1068K	Invitrogen [™] , Karlsruhe
Gentamycin	10 mg/ml	CC-Pro, Neustadt
HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure	Steril, Stammlösung 1 mol/l	CC-Pro, Neustadt
Humane Hepatozyten	HepG2, HB8065	ATCC, Manassas, U.S.A.
L-Glutamin	Steril, 200 mM	PAA, Pasching
Minimal Essential Medium (MEM) mit Earles Salzen ohne L-Glutamin	Steril	CC-Pro, Neustadt
Natriumpyruvat	Steril, 100x, 100 mM	CC-Pro, Neustadt
Nicht-essentielle Aminosäuren (MEM-NEAA)	100x	CC-Pro, Neustadt
Trypsin/EDTA-Lösung	10x	CC-Pro, Neustadt

Tabelle 3-6: Laborzubehör im Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin

Bezeichnung	Modell / Ausführung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius LE 225 D-OCE	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Systec 2540 EL	Wettenberg
Gasbrenner		Schütt, Göttingen
Lichtmikroskop	Labovet FS	Leitz, Wetzlar
Neubauer-Kammer	0,0025 mm ² x 0,1 mm	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe	Pipetus [®]	Hirschmann [®] Laborgeräte, Eberstadt
Sicherheitswerkbank für mikrobiologische und biotechnologische Arbeiten	nach DIN 12950, Typ MRF-B	Steag laminarflow Prozesstechnik GmbH, Pfullingen
Sterile Einwegpipetten	Cellstar [®] , diverse Volumina	Greiner Bio-One, Frickenhäusen
Sterile PP-Teströhrchen	Cellstar [®] , 10 und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhäusen
Vent-Schraubkappen		TPP [®] , Trasadingen, Schweiz

Tabelle 3-6: Laborzubehör im Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin (Fortsetzung)

Bezeichnung	Modell / Ausführung	Hersteller
Wasserbad	GFL [®]	Großburgwedel
Brutschrank	Water-Jacket Incubator 3548/3336	Thermo Forma, Marietta, Ohio, U.S.A.
Zellkulturflaschen	25 cm ² und 75 cm ²	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Osterode
Zytostatika Werkbank (Inkubation)	EN 12469: 2000/DIN 12980, Modell Z100	Schulz Lufttechnik GmbH, Sprockhövel

3.2 Analysengeräte

3.2.1 GC/MS

In den Tabellen 3-7 und 3-8 sind die Komponenten und die Betriebsbedingungen des verwendeten GC/MS-Systems dargestellt.

Tabelle 3-7: Komponenten des GC/MS-Systems

Komponente	Modell/Ausführung	Hersteller
Autosampler	Combi Pal	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Injektor	UNIS 2000 PTV	Joint Analytical Systems, Moers
Gaschromatograph (GC)	6890 N	Agilent Technologies, Waldbronn
Massenspektrometer (MS)	5973 MSD, Gold-beschichteter Quarz-Quadrupol	Agilent Technologies, Waldbronn
Software	Enhanced ChemStation	
Kapillarsäule	HP-5 MS, 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm	Agilent Technologies. Waldbronn
Betriebsgas	Helium 5.0	Air Liquide, Düsseldorf

Tabelle 3-8: Betriebsparameter des GC/MS-Systems

Betriebsparameter	Einstellung
Säulenfluss	1,5 ml/min
Trägergasfluss	42 cm/s
Ionisierungsart	EI (Elektronenstoßionisation, engl. electron impact)
Temperatur der Transferleitung	280 °C
Temperatur der Ionenquelle	230 °C
Temperatur des Quadrupols	150 °C
Ionisierungsenergie	70 eV

3.2.2 ICP-MS

Für die Gesamtmetallanalytik flüssiger Proben und der Aufschlüsse fester Proben wurden zwei ICP-MS verwendet (Agilent 7500 a und Agilent 7500 CE, beide Agilent Technologies, Waldbronn). Nachfolgend sind die enthaltenen Komponenten beider ICP-MS aufgeführt:

Tabelle 3-9: Komponenten des ICP-MS

Komponente	Modell/Ausführung
Probenaufgabe	Peristaltik-Pumpe
Sprühkammer	Scott-Typ
Zerstäuber	Mikroflow-Nebulizer nach Meinhard, Förderrate 100 µl/min
Massenspektrometer (MS)	Quadrupol-MS

Die Betriebsbedingungen des ICP-MS wie Hochfrequenzleistung, Spannungen der Ionenlinsen, Gasflüsse, etc. wurden vor der Messung so angepasst, dass robuste Plasmabedingungen erhalten und Matrixeffekte minimiert wurden.

3.2.3 LT-GC/ICP-MS

Die Speziesanalytik erfolgte mit einer Kopplung von Tieftemperatur-Gaschromatographie (LT-GC, engl. low temperature-gas chromatography) und dem ICP-MS. Hierbei wurde die Kopplung durch einen FEP-Schlauch (Länge 1 m, AD 1/16“, ID 0,75 mm, CS-Chromatographie, Langerwehe), welcher mit einem auf 150 °C geheizten Kupferrohr (ID 1/16“) ummantelt ist, als Transferleitung realisiert. Die eine Seite der Transferleitung ist über eine Swagelog-Verschraubung direkt mit der GC verbunden; die andere Seite mündet über ein Y-förmiges Quarz-Transferstück im ICP-MS.

Die einzelnen Bauteile wie z. B. die Kühlfallen und die Chromatographiesäule wurden mit möglichst kurzen FEP-Schläuchen (AD 1/16“, ID 0,75 mm, CS-Chromatographie, Langerwehe) und Swagelok-Verschraubungen verbunden. Die technischen Daten der Kühlfallen und der gepackten Chromatographiesäule sind in Tabelle 3-10 aufgeführt.

Tabelle 3-10: Technische Daten der Chromatographiesäule und der Kühlfalle

	Chromatographiesäule	Kühlfallen
Länge	80 cm	20 cm
Innendurchmesser	5 mm	5 mm
Außendurchmesser	8 mm	8 mm
Masse (10 % SP™-2100 on 80/100 Supelcoport)	6,38 g	1,59 g

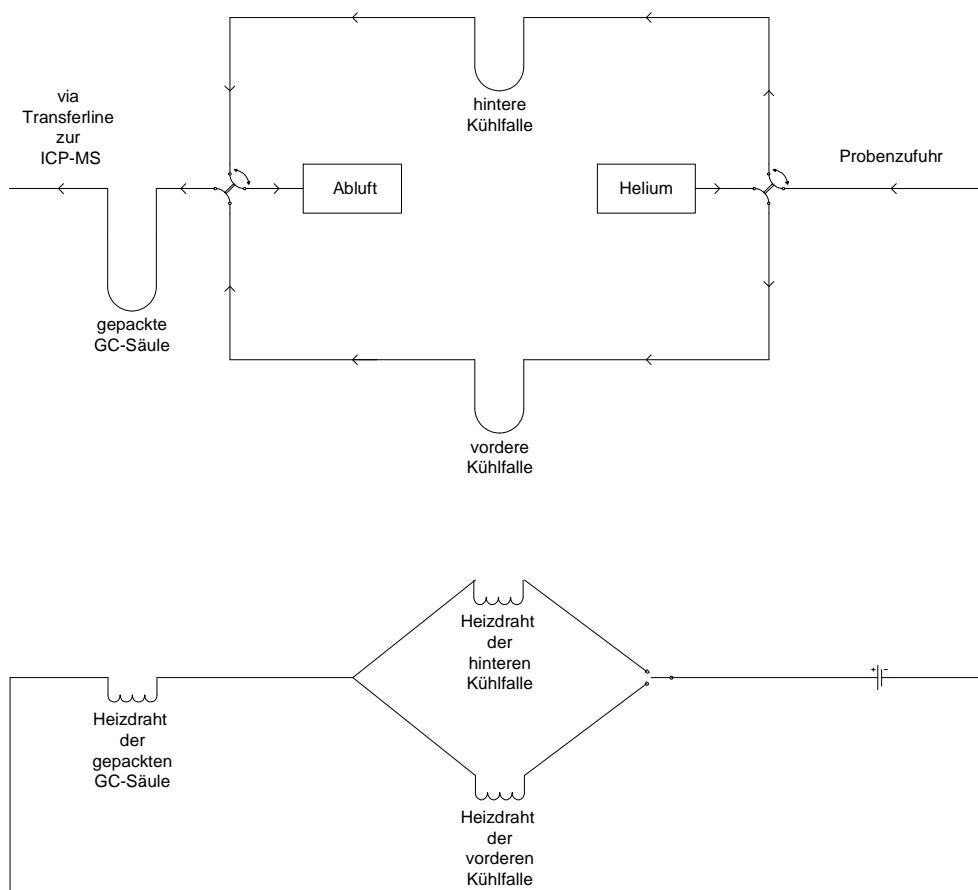


Abbildung 3-1: Schematischer Aufbau der gaschromatographischen Purge&Trap-Einheit und des Schaltkreises der Widerstandsheizdrähte

Zur Durchführung der Messung einer Probe und der simultanen Vorbereitung einer weiteren Probe *via* Purge&Trap enthielt die Versuchsanordnung zwei Kreisläufe, die durch 4-Wege-Hähne (Hamilton, Bellefonte, U.S.A.) ineinander überführt werden konnten. Diese Anordnung ermöglichte einen höheren Durchsatz von Analysenproben und somit eine effektive Nutzung der Messzeit.

Die Kühlfallen und die Chromatographiesäule waren mit Widerstandsheizdrähten ummantelt, um einerseits eine thermische Desorption der Analyten von den Kühlfallen und andererseits die Einstellung eines Temperaturgradienten für die Chromatographiesäule zu ermöglichen.

In Abbildung 3-1 sind der schematische Aufbau der Purge&Trap-Einheit und der Schaltkreis der Widerstandsheizdrähte dargestellt.

3.2.4 GC/EI-MS/ICP-MS

Zur Identifizierung metallorganischer Verbindungen wurde die im hiesigen Institut entwickelte simultane Detektion mittels molekülspezifischer EI-MS und elementspezifischer ICP-MS nach erfolgter gaschromatographischer Trennung verwendet (Abbildung 3-2, KÖSTERS ET AL. 2005, KÖSTERS 2006).

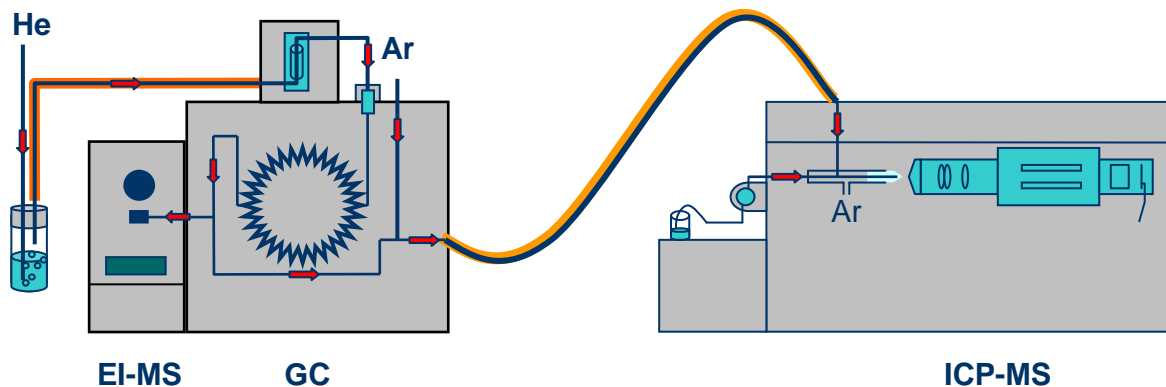


Abbildung 3-2: Schematischer Aufbau der GC/EI-MS/ICP-MS

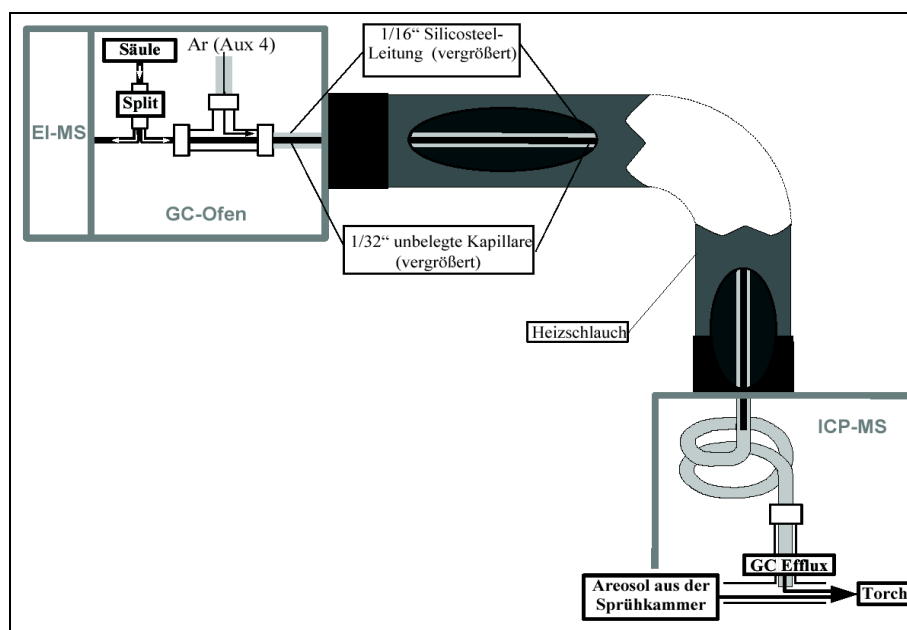


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Transferleitung vom GC-MS zum ICP-MS (KÖSTERS ET AL. 2005)

Die Probenaufgabe ist sowohl mittels Purge&Trap als auch über eine Flüssiginjektion möglich. In dieser Arbeit wurde nur mit der Purge&Trap-Aufgabe gearbeitet. Die umfangreichen Parametereinstellungen sind in den Tabellen 3-11, 3-12 und 3-13 aufgeführt.

Tabelle 3-11: GC-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung

GC - Purge&Trap	
Kapillarsäule	HP-5 MS, 0,25 mm x 25 µm x 30 m
Trärgas	He, 5 ml/min
Injektorbedingungen (PTV)	
Starttemperatur	-100 °C
Split	1:5
Heizrate	800 °C/min
Endtemperatur	230 °C

Tabelle 3-11: GC-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung (Fortsetzung)

GC-Ofen (Heizprogramm)	
Starttemperatur	40 °C für 1 min
Heizrate 1	100 °C/min
Endtemperatur 1	110 °C für 1 min
Heizrate 2	100 °C/min
Endtemperatur 2	280 °C

Tabelle 3-12: EI-MS-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung

EI-MS	
Gemessenes Massenfenster (Scan Modus)	m/z 39–550
Temperatur der Transferleitung	275 °C
Temperatur des Quadrupols	150 °C
Temperatur der MS-Quelle	230 °C
Ionisierungsenergie	70 eV

Tabelle 3-13: ICP-MS-Bedingungen der GC/EL-MS/ICP-MS-Kopplung

ICP-MS	
Argonfluss	15 l/min
Transportgas	0,53 l/min
Hilfsgas	0,56 l/min
Hochfrequenzleistung	1580 W
Sampling depth	4,6 mm
Gemessene Isotope/Dwell time	²⁰⁹ Bi (0,1 s)

3.2.5 ADVIA[®] Chemistry System

Die Kreatininbestimmung in Urinproben erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 505 nm mit einem ADVIA[®] 1650 Chemistry System (Bayer Healthcare, Leverkusen) durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Essen.

3.3 Auswertungssoftware

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft[®] Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.), Microcal[™] Origin[™] (Versionen 5.0, 6.0, 6.1 und 7.0, Microcal Software Inc., Nordhampton, U.S.A.) und die Chemstation (Version B 03.04, Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A) verwendet.

4 Experimenteller Teil

4.1 Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora

4.1.1 Motivation und Zielsetzung

Nach einem Pilotversuch mit drei Probanden (HIRNER ET AL. 2004) sollte in dieser Studie die Bedeutung der mikrobiellen Umsetzung von Metallen und Metalloiden im humanen Organismus untersucht werden. Hierfür wurden 20 ausschließlich männlichen Probanden im Alter zwischen 25 und 35 Jahren nach Aufklärung, schriftlicher Einverständniserklärung und ärztlicher Untersuchung (Krankheitsanamnese, körperliche Untersuchung, EKG, Blutdruck, Untersuchung von Blut, Urin und Stuhl) 215 mg Bismut in Form von kolloidalem Bismutsubcitrat (CBS) von einem Arzt verabreicht. Hierbei wurde Bismut aus mehreren Gründen verwendet:

a) Menschen sind durch Bismut-haltige Pharmaka und Kosmetika gegenüber Bismut exponiert (MENGE ET AL. 1992; BRIAND UND BURFORD 1999; SUN ET AL. 2004; YANG UND SUN 2007). Zum Beispiel werden Bismutsubcitrat und andere Bismut-Verbindungen zur Behandlung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren und zur Ausrottung von *Helicobacter pylori* verwendet. Bismutsubsaliicylat ist in relativ hohen Konzentrationen (1-2 %) in nicht verschreibungspflichtigen Medikamenten zur Behandlung von Magen- und Darmverstimmungen enthalten. BiOCl wird in Lippenstiften verwendet, da es diesen einen perlmuttartigen Glanz verleiht.

b) Anorganische Bismut-Verbindungen zeigen eine geringe Toxizität; so beträgt die LD₅₀ für BiOCl (Ratte, oral) 22000 mg/kg (SOLLMANN UND SEIFTER 1939). Neurologische Störungen wurden üblicherweise nach der oralen Aufnahme von bis zu 20 g Bismut-Salz pro Tag über einen Zeitraum von 20 Tagen pro Monat beobachtet (SLIKERVEER UND DE WOLFF 1989; SUN ET AL. 2004). Nichtsdestoweniger treten toxische Effekte selten auf, wenn die Bismut-haltigen Medikamente in den empfohlenen Dosen eingenommen werden, was möglicherweise mit der geringen Resorption dieses Metalls im Körper einhergeht (SUN ET AL. 2004). Aus diesem Grund sind Bismut-haltige Medikamente geeignete Modellverbindungen zur Untersuchung der Biotransformation von Metallen im menschlichen Körper.

c) Der humane Bismut-Metabolismus ist bisher unbekannt. Im Wesentlichen beschränkt sich das Wissen auf die Pharmakokinetik, Transportprozesse, die Toxizität, Bismut-Protein-

Wechselwirkungen und die Anwendung von Bismut-Verbindungen bei der Ausrottung von *Helicobacter pylori* (SUN ET AL. 2004)

d) Bismut wird durch Mikroorganismen in der Umwelt methyliert. Flüchtige Bismut-Verbindungen wurden im Deponie- und Klärgas detektiert und nicht flüchtige Methylspezies wurden in Wasser- und Sedimentproben gefunden (FELDMANN 1999). Zudem wurde die Bildung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ und BiH_3 durch das *Methanobacterium formicicum* in Klärschlamm gezeigt (MICHALKE ET AL. 2000, 2002). Einige der im Klärschlamm enthaltenen Mikroorganismen sind bekannte Komponenten der humanen intestinalen Mikroflora.

e) Die Analytik von Bismut und seiner Metaboliten wird durch geringe Bismut-Hintergrundkonzentrationen in der Bevölkerung ermöglicht.

Das Monitoring der Umweltprobenbank des Bundes - Teilbank Humanproben - lieferte in den Jahren 2002-2006 für männliche Probanden Bismut-Konzentrationen in Blutproben von 0,43 bis 66,52 ng/l (Mittelwert = $5,90 \pm 6,58$ ng/l, Median = 4,20 ng/l) und im 24-Stunden-Urin von 0,17 bis 59,13 ng/l (Mittelwert = $4,02 \pm 5,76$ ng/l, Median = 2,71 ng/l) (WIESMÜLLER, PERSÖNLICHE MITTEILUNG).

4.1.2 Studienteilnehmer und Studiendesign

Das Studienkollektiv umfasste 20 gesunde männliche Probanden (Alter = 24-31 Jahre, Mittelwert = 27,2 Jahre; Gewicht = 61-102 kg, Mittelwert = 82,5 kg; Body Mass Index = 20-31, Mittelwert = 25) mit Wohnort in Essen. Ein Proband (ID = 005) nahm zweimal an der Studie teil, sodass 21 Datensätze erhalten wurden. Die Teilnehmer nahmen keine Medikamente und waren gesund auf der Basis ihrer Anamnese, einer körperlichen Untersuchung und einem Laborscreening von Blut-, Urin- und Fäzesproben. Der Umfang des Laborscreenings ist im Anhang (Kapitel 11.1, S. 129) aufgeführt. Die Probanden waren zudem Nichtraucher und hatten keine Stoffwechselstörungen oder Störungen des Gastrointestinaltraktes. Die medizinischen Voruntersuchungen wurden am Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen durch Herrn Dr. Frank Mosel durchgeführt. Die Studienteilnehmer wurden vorher über mögliche Risiken aufgeklärt und haben hierzu schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Die Studie wurde durch das Ethikkomitee des Universitätsklinikums Essen genehmigt, und sie stimmte mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki überein (THE WORLD MEDICAL ASSOCIATION 2007)

Am ersten Tag der Studie wurden um 9:00 morgens zwei Tabletten kolloidales Bismut-subcitrat (De-Nolab[®], Yamanouchi Europe B.V., Niederlande), die insgesamt 215 mg Bismut enthalten, mit einem Becher Leitungswasser eingenommen. Hierbei wurden die Probanden aufgefordert, die Tabletten nicht zu zerkauen.

4.1.3 Probenahme und Analytik

Die Atemluft- und Blutproben wurden vor der Einnahme des Bismut-Präparats ($t = 0$) und nach $t = 1, 2, 4, 8, 24, 48$ Stunden gesammelt; zudem wurde Blut nach $t = 30$ Minuten, 32 und 56 Stunden gesammelt. Urin- und Fäzesproben wurden vor dem Beginn der Studie und als Spontanproben während der gesamten Studiendauer gesammelt. Zudem wurden die Probanden darum gebeten, das zugehörige Urinvolumen, die Masse der jeweiligen Stuhlprobe sowie das Datum und die Uhrzeit der Probennahme zu notieren.

Die Atemluft wurde in 10 l-Tedlar[®] bags (Supelco[®], Taufkirchen) gesammelt, in Kühlfallen transferiert und bei -80 °C (Ethanol/fl. Stickstoff) ausgefroren oder sofort, wie nachfolgend beschrieben, analysiert. Blut- (Citrat-stabilisiert, S-Monovette[®], 10 ml, SARSTEDT, Nürnberg-Rommelsdorf), Urin- und Fäzesproben wurden bis zur Analyse bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

Im Rahmen der Probandenstudie wurden folgende Analysen durchgeführt:

- a) Bismut-Speziationsanalytik der Atemluftproben *via* LT-GC/ICP-MS
- b) Gesamtmetallanalytik nach Mikrowellendruckaufschluss *via* ICP-MS und Bismut-Speziationsanalytik *via* LT-GC/ICP-MS in Blutproben
- c) Gesamtmetallanalytik nach Mikrowellendruckaufschluss *via* ICP-MS und photometrische Kreatininbestimmung in Urinproben
- d) Gesamtmetallanalytik nach Mikrowellendruckaufschluss *via* ICP-MS von Fäzesproben.

Die Gesamtmetallanalytik wurde in dieser Studie von Frau Dr. Margareta Sulkowski vorgenommen. Die Kreatininbestimmungen wurden von Mitarbeitern des Zentrallabors des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

4.2 Kinetik eines Probanden mit größerer Zeitauflösung nach Ingestion von Bismutsubcitrat

4.2.1 Motivation und Zielsetzung

Aufbauend zur unter 4.1 (S. 46) beschriebenen Studie sollten durch die Untersuchung eines einzigen Probanden über einen Zeitraum von 80-120 Stunden nach Bismutgabe weitere Ergebnisse zum Bismut-Metabolismus im menschlichen Körper erhalten werden. Hierfür wurden im Wesentlichen vier Änderungen im Studienablauf vorgenommen:

- a) Die Erweiterung des Studienzeitraums auf bis zu fünf Tagen, um anhand eines umfangreichen Zeitprofils ggf. Aussagen über den Ort der Bismut-Methylierung treffen zu können (Leber/Niere vs. Darm).
- b) Die Erhöhung der Probenahmefrequenz von Atemluft- und Blutproben und eine daraus resultierende größere Zeitauflösung mit dem Ziel, sowohl die Konzentrationsmaxima als auch die Halbwertszeiten von Bismut und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ präziser bzw. präzise zu bestimmen und anhand des zeitlich gut aufgelösten Eliminationsmusters weitere Informationen über den Ort der Bismut-Methylierung zu erhalten.
- c) Die quantitative Sammlung der Fäzesproben, um sie nach der Homogenisierung, dem Aufschluss und der Messung mit in die Massenbilanz einbeziehen zu können.
- d) Die Variation der eingenommenen Bismut-Dosis (2 x je 215 mg bzw. 1 x 430 mg) unter Ausschluss der interindividuellen Variation wurde wegen unterschiedlichster Fragestellungen vorgenommen:
- Wie groß ist die individuelle Variation von Resorption, Halbwertszeit, etc. bei gleicher Bismut-Dosis?
 - Führt eine Verdopplung der eingenommenen Bismut-Dosis zur Verdopplung der Resorption, der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion und zu einer signifikanten Veränderung der Halbwertszeit und welche Aussagen kann man hieraus für die Methylierung des Bismuts im menschlichen Körper ableiten?

4.2.2 Studienteilnehmer und Studiendesign

Der in Essen wohnende männliche Proband war in den Studienzeiträumen 33-34 Jahre alt, wog 75 kg und hatte einen Body Mass Index von 25 kg/m^2 . Die medizinische Voruntersuchung, die Aufklärung zur Studie und die Erklärung zum Einverständnis wurden wie unter 4.1.2 (S. 47) beschrieben durchgeführt.

Diese Studie wurde dreimal in einem Abstand von mindestens drei Monaten durchgeführt. Der zeitliche Abstand sollte einerseits die Bismut-Hintergrundkonzentration des Probanden nach jeder Bismutgabe minimieren und andererseits den Einfluss der Entnahme großer Blutmengen (bis zu 500 ml) auf die Blutzusammensetzung ausschließen. Während des Monitorings wurden am ersten Studientag um 9:00 morgens zweimal jeweils zwei Tabletten CBS (De-Nolab[®], Yamanouchi Europe B.V., Niederlande), mit insgesamt 215 mg Bismut und einmal vier Tabletten CBS mit insgesamt 430 mg Bismut eingenommen. Hierbei wurden die Tabletten vom Probanden nicht zerkaut und mit Leitungswasser eingenommen.

4.2.3 Probennahme und Analytik

Die Probennahme erfolgte wie unter 4.1.3 (S. 48) beschrieben, jedoch wurden die Zeitpunkte der Probennahme den bis dato erzielten Ergebnissen angepasst. Zunächst wurde in allen Matrices (Atemluft-, Blut-, Urin- und Fäzesproben) eine Blindprobe genommen. Anschließend erfolgte die Beprobung der Atemluft in variablen Abständen zwischen 15 Minuten und drei Stunden nach der Bismutgabe, um einen tageszeitlichen Verlauf und präzise Maxima zu erhalten. Die Blutproben für die Gesamtmetallbestimmung wurden innerhalb der ersten drei Stunden in Abständen von 10 Minuten genommen, da in dieser Zeit das Konzentrationsmaximum erwartet wurde. Anschließend wurde die Probennahme ebenfalls variabel im Abstand von 1-12 Stunden durchgeführt. Urin- und Fäzesproben wurden während der gesamten Studiendauer als Spontanproben gesammelt. Hierbei wurde ein Aliquot jeder Urinprobe und die gesamte Fäzesprobe aufbewahrt. Nach der Dokumentierung von Probennahmezeitpunkt und dem Volumen/der Masse der Proben wurden alle Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert.

Im Rahmen der Studie wurden die nachfolgenden Analysen durchgeführt:

- a) Bismut-Speziationsanalytik der Atemluftproben *via* LT-GC/ICP-MS
- b) Gesamtmetallanalytik nach Mikrowellendruckaufschluss *via* ICP-MS und Bismut-Speziationsanalytik *via* LT-GC/ICP-MS in Blut- und Fäzesproben
- c) Gesamtmetallanalytik nach Mikrowellendruckaufschluss *via* ICP-MS und photometrische Kreatininbestimmung in Urinproben

Die Bismutspeziationsanalytik in der Atemluft nach Gabe von 430 mg wurde von Herrn cand. Dipl.-Chem. Markus Hollmann vorgenommen. Die Kreatininbestimmungen wurden von Mitarbeitern des Zentrallabors des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

4.3 Untersuchungen an humanen Hepatozyten zur Bismut-Methylierung

4.3.1 Motivation und Zielsetzung

Im Rahmen der unter 4.1 und 4.2 beschriebenen Probandenstudien konnte $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Atemluft-, Blut- und des Fäzesproben (nur 4.2, S. 48) der Probanden nach Verabreichung von kolloidalem Bismutsubcitrat detektiert werden. MICHALKE ET AL. (2007) zeigten, dass *post applicationem* inkubierte Fäzesproben u. a. $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ produzieren können und somit einen starken Hinweis auf die Beteiligung der intestinalen Mikroflora an den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft und dem Blut liefern. Zudem waren und sind jedoch auch weitere Methylierungsreaktionen denkbar. MICHALKE ET AL. (2002) konnten Bismut *in vitro* mit Methyl-

cobalamin zu $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ methylieren, weshalb ein Methylierungspotenzial der humanen Leber als möglich erscheint. Daher sollte zunächst der Headspace einer mit Bismut-Verbindungen (CBS, Bismutcystein und Bismutglutathion) inkubierten humanen Hepatozytenkultur mittels LT-GC/ICP-MS vermessen werden, um auf diesem Wege einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Leber an der Bildung flüchtiger Bismut-Spezies zu erhalten. Zudem sollte das Zelllysate ethyliert werden, um durch die anschließende Detektion von teil- oder der perethylierten Bismut-Spezies Hinweise auf die Beteiligung von Leberzellen auf die Methylierung von Bismut im humanen Organismus zu erhalten.

Die hier verwendeten HepG2-Zellkulturen wurden von Frau Gabriele Zimmer aus der Arbeitsgruppe *In-vitro*- und Molekulare Toxikologie (Leiterin: PD Dr. Elke Dopp) des Universitätsklinikums Essen nach den nachfolgend beschriebenen Methoden gezüchtet und anschließend bereitgestellt.

Die Synthese von und die Messungen mit Bismutcystein und Bismutglutathion wurden von Herrn cand. Dipl.-Chem. Markus Hollmann durchgeführt.

4.3.2 Auftauen humaner Hepatozyten

Die unter flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrte HepG2-Zelllinie (ATCC, HB 8065, Manassas, U.S.A.) wurde nach der Entnahme aus dem Dewar vorsichtig durch leichtes Schwenken in einem Wasserbad ($T = 37\text{ }^\circ\text{C}$) aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in 8 ml, ebenfalls auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmtes Minimal Essential Medium (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 0,5 % Gentamycin, 1 % L-Glutamin, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA) und 1 % Natriumpyruvat (alle Reagenzien von CC-Pro, Neustadt), überführt. Nach leichtem Schütteln wurde für 5 Minuten bei 187 g zentrifugiert, um das Kryoprotektiv Dimethylsulfoxid (DMSO) aus den Zellen zu entfernen. Nach dem Abpipettieren und Verwerfung des Zentrifugats wurde das Zellpellet in 10 ml MEM resuspendiert. Hiervon wurden je 5 ml in eine 25 cm^2 -Zellkulturflasche (TPP[®], Trasadingen, Schweiz) pipettiert und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 (V/V) kultiviert (Water-Jacket Incubator 3548/3336, Thermo Forma, Marietta, Ohio, U.S.A.). Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte dreimal wöchentlich (Mo, Mi, Fr). Hierzu wurde das überstehende Medium abpipettiert und durch neues, auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmtes Medium ersetzt.

4.3.3 Kultivierung/Passage humaner Hepatozyten

Nach dem Erhalt eines flächendeckenden Zellrasens nach der unter 4.3.3 beschriebenen Methode wurde das MEM entfernt und die Zellen mit 5 ml D-PBS (Gibco[®], Invitrogen[™], Karlsruhe) gespült.

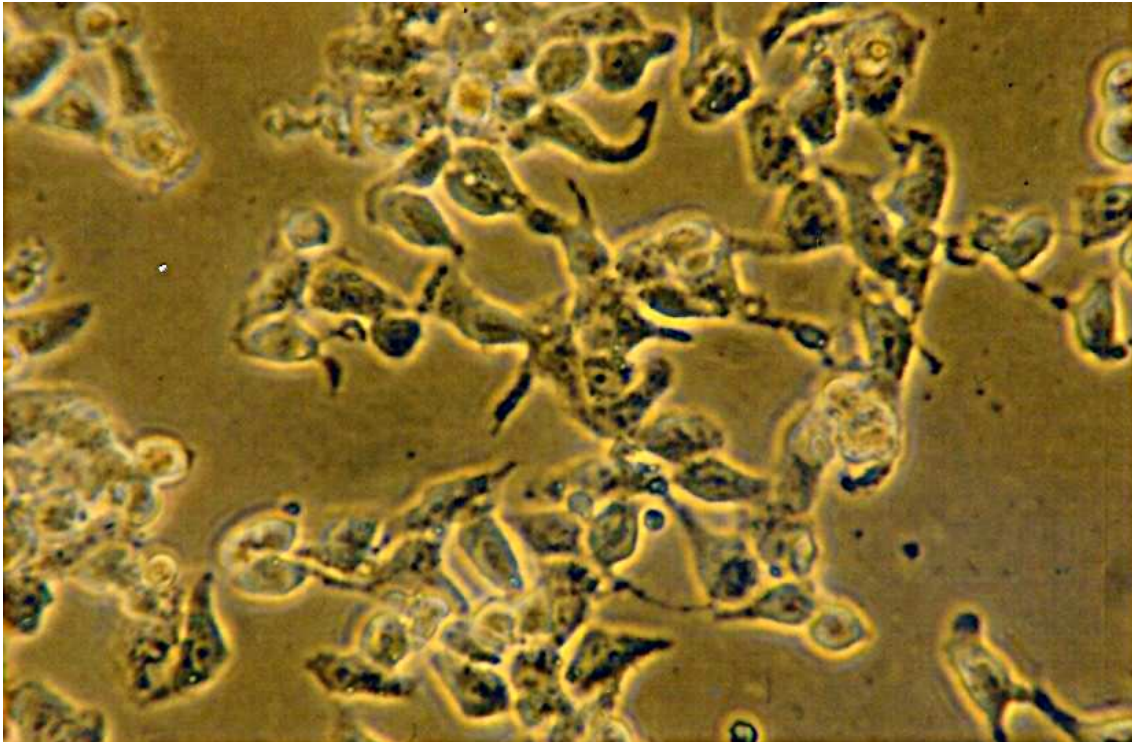


Abbildung 4-1: Lichtmikroskopische Aufnahme von HepG2-Zellen (20-fache Vergrößerung, DOPP 2008)

Sowohl das Medium und das D-PBS wurden hierbei anschließend verworfen. Nach Zugabe von 3 ml 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (CC-Pro, Neustadt) wird 30 Sekunden gewartet, die überstehende Lösung abpipettiert und 3 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ (V/V) inkubiert. Nach Resuspendierung der Zellen in 5 ml MEM wurde die Zellsuspension auf zwei 75 cm²-Zellkulturflaschen (TPP[®], Trasadingen, Schweiz) aufgeteilt, die zuvor mit je 15 ml MEM beschickt wurden. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ (V/V) inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgt dreimal wöchentlich (Mo, Mi, Fr). Nach jeder Aufteilung der Zellenlinie auf mehrere Kulturflaschen erhielten die Zellen stets eine um eins höhere Passagenzahl, welche ebenfalls notiert wurde (P1 = Passage 1, P2 = Passage 2 etc.).

4.3.4 Zählung humaner Hepatozyten

Die sich in der Zellkulturflasche befindliche Zelllinie wurde mittels Pipette vom Medium befreit und mit 5 ml D-PBS gewaschen. Sowohl das D-PBS als auch das Medium wurden verworfen. Nach Zugabe von 3 ml 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung wurde 30 Sekunden gewartet, die überstehende Lösung abpipettiert und 3 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ (V/V)

inkubiert. Anschließend wurden die Hepatozyten in 5 ml MEM resuspendiert und in 0,1 μ l der Zellsuspension die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer (0,0025 mm² x 0,1 mm, Brand, Wertheim) unter dem Lichtmikroskop (20-fache Vergrößerung) bestimmt. Hierbei wurden mindestens vier Felder, die aus je 16 Quadranten bestehen, mäanderförmig ausgewertet.

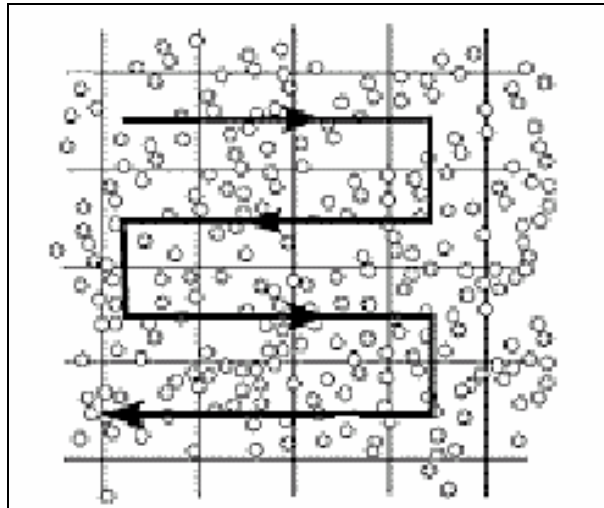


Abbildung 4-2: Darstellung der mäanderförmigen Auszählung von Hepatozyten an einem Neubauer-Zählgitter (LO-LABOROPTIK, 2005)

4.3.5 Synthese von kolloidalem Bismutsubcitrat (CBS)

In einem tarierten und sterilen 50 ml-Probengefäß wurden 0,115 g Bismutcitrat (> 98 %, Sigma-Aldrich, Steinheim) vorgelegt und in 1,5 ml Ammoniaklösung (25 %, AppliChem, Darmstadt) gelöst. Nach Zugabe von 40 g D-PBS (Gibco[®], Invitrogen[™], Karlsruhe) wurde die klare Lösung tropfenweise mit HCl (30 %, Suprapur[®], Merck, Darmstadt) auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Anschließend wurde die kolloidale Lösung bis zu einer Gesamtmasse von 50 g mit D-PBS aufgefüllt. Die Synthese wurde nach ASATO ET AL. (1995) durchgeführt.

4.3.6 Synthese von Bismutglutathion (GSH)₂Bi

In einem 10 ml-Vial, versehen mit Rührfisch, Butylkautschuk-Septum und zwei Einmal-Injektions-Kanülen, die mit der Argonzuleitung und einem Überdruckventil verbunden sind, werden 6,75 g (22 mmol) Glutathion vorgelegt und ca. 15 Minuten mit Argon gespült. Anschließend werden 2 ml Reinstwasser zugegeben, so dass eine gesättigte Lösung entsteht. Das geschlossene Vial wird im Argonstrom geöffnet und mit einem Spatel werden 3,16 g (10 mmol) BiCl₃ zugegeben. Anschließend wird die gelbliche Reaktionslösung im Argonstrom bis zum Ausfallen eines gelben Feststoffes gerührt. Dieser wird mit einem Schnelllauftrichter und Blaubandfilter als Filtermedium isoliert und im Vakuum-Exsikkator über Silica-

Gel mehrere Tage getrocknet (BURFORD ET AL. 2003). Die Umsetzung kann durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



4.3.7 Synthese von Bismutcystein (Cys)₂Bi

In einem 10 ml-Vial, versehen mit Rührfisch, Butylkautschuk-Septum und zwei Einmal-Injektions-Kanülen, die mit der Argonzuleitung und einem Überdruckventil verbunden sind, werden 2,67 g (22 mmol) L-Cystein vorgelegt und ca. 15 Minuten mit Argon gespült. Anschließend werden 2 ml Reinstwasser zugegeben, so dass eine gesättigte Lösung entsteht. Das geschlossene Vial wird im Argonstrom geöffnet und mit einem Spatel werden 3,16 g (10 mmol) BiCl₃ zugegeben. Anschließend wird die gelbliche Reaktionslösung im Argonstrom bis zum Ausfallen eines gelben Feststoffes gerührt. Dieser wird mit einem Schnelllauftrichter und Blaubandfilter als Filtermedium isoliert und im Vakuum-Exsikkator über Silica-Gel mehrere Tage getrocknet (BURFORD ET AL. 2003). Die Umsetzung kann durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden:



4.3.8 Inkubation von HepG2-Zellen mit Bismutsubcitrat, Bismutglutathion und Bismutcystein

Am Vortag der Inkubation wurden 10⁶ HepG2-Zellen pro Zellkulturflasche eingesät und mit 5 ml MEM über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurde mittels Lichtmikroskop (20-fache Vergrößerung) überprüft, ob die adhärennten Zellen an den Flaschenboden angewachsen waren. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abpipettiert und durch 10 ml vorgewärmtes HEPES-Medium (25 mmol/l) ersetzt. Hierbei dient das HEPES-Medium als Puffer, weil der für die pH-Pufferung notwendige CO₂-Austausch mit der Umgebung nicht mehr möglich war. Nach der Zugabe von 1 ml CBS-, Bi(GSH)₂- oder Bi(Cys)₂-Lösung wurden die Deckelgewinde mit Teflon[®]-Gewindeband umwickelt und durch Vent-Schraubkappen (TPP[®], Trasadingen, Schweiz) gasdicht verschlossen und 24 h bei 37 °C inkubiert.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Gesamtmetallanalytik in Blut-, Urin- und Fäzesproben

Die Bismut-Konzentrationen in Blut-, Urin- und Fäzesproben wurden mittels ICP-MS nach Mikrowellendruckaufschluss (MARS 5, CEM, Kamp-Lintfort) der Proben mit HNO₃/H₂O₂ bestimmt. Der Probenaufschluss erfolgte in geschlossenen PFA-Gefäßen (XP 1500 plus,

CEM, Kamp-Lintfort), in denen die Probe vorgelegt und HNO_3 (65 %, subboiled) und 2 ml H_2O_2 (30 %, Suprapur[®], Merck, Darmstadt) hinzugefügt wurde. Probenvolumen/ Probenmassen bzw. die Aliquote der zugegebenen HNO_3 waren wie folgt: Blut 2-3 ml, 3 ml; Urin 4 ml, 3 ml; Fäzes 0,1-0,5 g, 4 ml. Die Mikrowellenparameter sind in Tabelle 4-1 dargestellt. Nach Abkühlung der Aufschlussgefäße auf 50 °C wurden diese geöffnet, der Inhalt in Probengefäße (50 ml, Cellstar[®], Greiner Bio-One) quantitativ überführt, mit 5 ppm Holmium als internem Standard versetzt und mit ultrareinem Wasser (18,2 M Ω -cm) auf ein Endvolumen von 30 ml (Blut- und Urinproben) oder 40 ml (Fäzesproben) vor der Analyse aufgefüllt. Die ICP-MS-Parameter wie Hochfrequenz-Leistung, Spannungen der Ionenlinsen, Gasflüsse usw. wurden so eingestellt, dass die Bildung von oxidierten und doppelt geladenen Analytione minimiert wurde. Die Analytlösungen (Fäzesproben bis zu 1:100 verdünnt) wurden mit einem Volumenstrom von 0,3 ml/min durch eine double-pass Scott-type Sprühkammer bei 2 °C ins ICP-MS überführt. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Kalibrierung. Die Validierung wurde mittels zertifizierter Referenzmaterialien (Seronom[™] Trace Elements in Whole Blood/Urine, Levels 1 und 2, SERO AS, Billingstad, Norwegen) durchgeführt.

Tabelle 4-1: Temperaturprogramme der Mikrowellendruckaufschlüsse für diverse Matrices

Matrix	Rampe (min)	Temperatur (°C)	Haltezeit (min)
Blut	10	80	10
	4	130	2
	4	200	10
Urin	4	80	2
	4	130	2
	4	200	10
Fäzes	8	80	2
	4	130	2
	4	200	10

4.4.2 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

In einem 10 ml-GC-Vial wurde 1 μl eines kommerziell erhältlichen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standards (Verzef Laborsynthesen, Idar-Oberstein) vorgelegt und mittels der von KOESTERS ET AL. (2005) entwickelten Kopplung von EI-MS und ICP-MS nach gaschromatographischer Trennung identifiziert. Hierbei erfolgte die Gaschromatographie mittels eines 6890 N (Agilent Technologies, Waldbronn), welcher mit einem UNIS 2000 Einlasssystem (Joint Analytical Systems, Moers, Germany) für temperaturprogrammierbare Verdampfung (PTV, engl. programmed temperature vaporisation) nach Purge&Trap-Aufgabe und einer Kapillarsäule ausgestattet

war. Zwei Detektionssysteme wurden gleichzeitig verwendet: Ein 5973 N EI-MS und ein 7500 a ICP-MS (beide von Agilent Technologies, Waldbronn). Die Betriebsparameter sind in den Tabellen 3-11 bis 3-13 (S. 44-45) aufgeführt.

4.4.3 Befüllung sowie Konditionierung der Kühlfallen und der gepackten Chromatographiesäule

Die Kühlfallen und die gepackte Chromatographiesäule wurden mit 10 % SPTM-2100 auf 80/100 Supelcoport (Supelco, Bellefonte, USA) befüllt und vor dem Gebrauch durch 16-stündiges Erhitzen auf 280 °C konditioniert. Die technischen Daten der Kühlfallen und der Chromatographiesäule (Sonderanfertigungen, bestehend aus Borosilikatglas) sind in Tabelle 3-10 auf Seite 42 aufgeführt.

4.4.4 Retentionszeitbestimmung von (CH₃)₃Bi via LT-GC/ICP-MS

In einer mit Argon gefüllten 100 ml-Gasmaus wurde durch ein Septum mit einer Mikroliter-spritze 1 µl des unter 4.4.1 charakterisierten (CH₃)₃Bi vorgelegt. Nach einminütigem Purgen mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min und Kryofokussierung in einer auf -80 °C (Ethanol/fl. Stickstoff) temperierten Kühlfalle konnte nach gaschromatographischer Trennung ein Signal für (CH₃)₃Bi nach $307,1 \pm 5$ s bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 209$ detektiert werden. Die gepackte Chromatographiesäule wurde hierbei zunächst auf -196 °C gekühlt und bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten auf 5,8 °C erwärmt. Anschließend erfolgte die Aufheizung der Säule mit einem Temperaturgradienten von 35 °C/min auf eine Endtemperatur von 150 °C.

4.4.5 Bestimmung von (CH₃)₃Bi in Atemluftproben

(CH₃)₃Bi in der Atemluft wurde *via* LT-GC/ICP-MS bestimmt (WICKENHEISER ET AL. 1998). Hierzu wurde eine 3 l-Teilprobe (3 Teilproben von 3 l pro Tedlar[®] bag) mit einer Vakuumpumpe durch eine auf -78 °C (Ethanol/fl. Stickstoff) temperierte Kühlfalle gesaugt und das Volumen mittels einer angeschlossenen Gasuhr bestimmt. Zeitgleich wurde die Chromatographiesäule mittels flüssigen Stickstoffs auf -196 °C gekühlt. Nach der Entfernung der Kältemischung wurden die Analyten thermisch von der Kühlfalle desorbiert und gaschromatographisch getrennt. Hierzu wurde die Trennsäule zunächst innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur von -196 °C auf 5,8 °C und dann durch einen Widerstandsheizdraht bei einer Heizrate von 35 °C/min auf eine Endtemperatur von 150 °C erhitzt.

4.4.6 Bestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Blutproben

In einem 100 ml-Dreihalskolben wurden 10 ml ultrareines Wasser sowie 100 μl einer Mischung aus Entschäumer und ultrareinem Wasser (1:100 (V/V) (Antifoam 289, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)) vorgelegt und der darin befindliche Luftsauerstoff 2 Minuten mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min ausgetrieben. Anschließend wurden die Blutproben aus den geschlossenen Citratröhrchen mit einer Spritze (5 ml, Becton Dickinson DiscarditTM II) und einer LUER-Kanüle (Sterican[®] 0,60 x 30 mm, Braun, Melsungen) entnommen und durch ein Septum in den Dreihalskolben überführt, um Analytverlust zu vermeiden. Die Blutgase wurden 8 Minuten mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min ausgetrieben, quantitativ in einer auf -78 °C temperierten Kühlfalle fokussiert und anschließend wie unter 4.4.5 *via* LT-GC/ICP-MS analysiert (GRÜTER ET AL. 2000).

4.4.7 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben *via* LT-GC/ICP-MS

In einem vom Luftsauerstoff befreiten 100 ml-Dreihalskolben wurden unter leichtem Helium-Gegenstrom ca. 1 g Fäzesprobe abgefüllt. Hierbei erfolgte die Massenbestimmung über eine Differenzwägung des Probengefäßes. Die in der Fäzesprobe enthaltenen Gase wurden 45 Minuten mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min ausgetrieben, quantitativ in einer auf -78 °C temperierten Kühlfalle fokussiert und anschließend wie unter 4.4.5 *via* LT-GC/ICP-MS analysiert.

4.4.8 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben *via* GC/MS

In einem 20 ml-Vial wurden unter Argonatmosphäre ca. 1 g Fäzesprobe eingewogen. Die Massenbestimmung erfolgte über eine Differenzwägung des Probengefäßes. Anschließend erfolgte unter den in den Tabellen 4-2 bis 4-4 dargestellten Bedingungen die Headspace-Analytik *via* GC/MS.

Tabelle 4-2: Temperaturprogramm des GC-Ofens

GC-Ofen (Temperaturprogramm)	
Starttemperatur	135 °C
Heizrate 1	100 °C/min
Endtemperatur 1	35 °C
Heizrate 2	15 °C/min
Endtemperatur 2	100 °C
Heizrate 3	100 °C/min
Endtemperatur 3	250 °C für 2 min

Tabelle 4-3: Injektoreinstellungen

Injektorbedingungen (PTV)	Hinterer Injektor
Starttemperatur	100 °C für 3 min
Split	5:1
Heizrate 1	800 °C/min
Endtemperatur 1	-100 °C
Heizrate 2	800 °C/min
Endtemperatur 2	230 °C
Heizrate 3	800 °C/min
Endtemperatur 3	100 °C

Tabelle 4-4: Messbedingungen bei der Analytik von Fäzesproben *via* GC/MS

Betriebsparameter	Einstellung
Purgezeit	5 min
Massenfenster (Scan Modus)	m/z = 190-350
Massen (SIM-Modus)	m/z = 209, 224, 239, 254
Threshold	100
Split	Splitless
Split flow	50 ml/min

Die weiteren Betriebsparameter des GC/MS-Systems sind in der Tabelle 3-8 (S. 41) dargestellt.

4.4.9 Bestimmung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben

In einem 100 ml-Dreihalskolben wurden 10 ml ultrareines Wasser sowie 100 µl einer Mischung aus Entschäumer und ultrareinem Wasser (1:100 (V/V)) vorgelegt und der darin befindliche Luftsauerstoff 2 Minuten mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min ausgetrieben. Anschließend wurden 50-150 mg Fäzesprobe im leichten Helium-Gegenstrom in den Kolben überführt. Hierbei erfolgte die Massenbestimmung über eine Differenzwägung des Probengefäßes. Die in der Fäzesprobe enthaltenen Gase wurden 45 Minuten mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min ausgetrieben, quantitativ in einer auf -78 °C temperierten Kühlfalle fokussiert und anschließend wie unter 4.4.5 *via* LT-GC/ICP-MS analysiert.

4.4.10 Speziesanalytik in Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien *via* LT-GC/ICP-MS

Die in der gasdichten Zellkulturflasche enthaltenen Gase wurden durch 30-minütiges Purgen mit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min in einer auf -80 °C temperierten Kühlfalle fokussiert und anschließend unter den gleichen Bedingungen wie Atemluft-, Blut- und Fäzesproben *via* LT-GC/ICP-MS analysiert.

4.4.11 Speziesanalytik in Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien und anschließender Ethylierung mittels Natriumtetraethylborat *via* GC/EI-MS/ICP-MS

Nach der Inkubation werden die Zellkulturflaschen drei Stunden bei -80 °C gekühlt. Unmittelbar vor der Überführung des Mediums in 20 ml-Vials wird die jeweilige Probe bei Umgebungstemperatur auf 25 °C erwärmt.

Die Überführung des Mediums erfolgt mit einer 10 ml-Einweg-Spritze mit aufgesteckter Kanüle, indem sowohl das vorher mit handelsüblichem Silikon befestigte Septum als auch die Schraubkappe der Zellkulturflasche durchstoßen werden. Daraufhin wird das befüllte Vial in den Helium-Purgegasstrom des Gaschromatographen zur Entfernung des Luftsauerstoffs eingebracht. Nach der Zugabe von 100 µl Entschäumer (1:100 (V/V), Antifoam 289, Sigma-Aldrich, Steinheim) wird die Messung simultan zur Zudosierung von 100 µl einer Natriumtetraethylborat-Lösung (1 %, in 2 % KOH-Lösung, Galab, Geesthacht) unter Verwendung folgender Parameter gestartet:

Tabelle 4-5: GC-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung

GC - Purge&Trap	
Kapillarsäule	HP-5 MS, 0,25 mm x 25 µm x 30 m
Druck an Aux 3 (Helium)	200 kPa
Druck Aux 4 (Argon)	35 kPa
Injektorbedingungen (PTV)	Vorderer Injektor
Starttemperatur	-100 °C
Split	50:1
Heizrate	800 °C/min
Endtemperatur	230 °C

Tabelle 4-5: GC-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung (Fortsetzung)

Injektorbedingungen (PTV)	Hinterer Injektor
Starttemperatur	100 °C für 3 min
Split	50:1
Heizrate 1	800 °C/min
Endtemperatur 1	-100 °C
Heizrate 2	800 °C/min
Endtemperatur 2	250 °C
Heizrate 3	800 °C/min
Endtemperatur 3	100 °C
GC-Ofen (Heizprogramm)	
Starttemperatur	60 °C
Heizrate 1	100 °C/min
Endtemperatur 1	35 °C
Heizrate 2	30 °C/min
Endtemperatur	230 °C

Tabelle 4-6: EI-MS-Bedingungen der GC/EI-MS/ICP-MS-Kopplung

EI-MS	
Gemessenes Massenfenster (Scan Modus)	m/z 200–400
Temperatur der Transferleitung	275 °C
Temperatur des Quadrupols	150 °C
Temperatur der MS-Quelle	230 °C
Ionisierungsenergie	70 eV

Tabelle 4-7: ICP-MS Parameter der GC/EI-MS/ICP-MS Messung

ICP-MS	Einstellung
Argonfluss	15 l/min
Transportgas	0,79 l/min
Hilfsgas	0,23 l/min
Hochfrequenzleistung	1540 W
Sampling depth	5,0 mm
Gemessene Isotope/Dwell time	²⁰³ Tl/0,1 s, ²⁰⁵ Tl/0,1 s und ²⁰⁹ Bi/0,1 s

4.4.12 Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ mittels LT-GC/ICP-MS

$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ wurde *via* LT-GC/ICP-MS bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 209$ (entsprechend ^{209}Bi) gemessen. Die Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erfolgte durch Integration der Gauss-Signale bei einer Retentionszeit von $307,1 \pm 5$ s und Interelement-Interaggregat-Kalibration (IIK, FELDMANN 1997). Die IIK verwendet wässrige anorganische Standards für die Spezies-unabhängige Quantifizierung von flüchtigen Spezies *via* LT-GC/ICP-MS und benötigt den effektiven Massenfluss der Sprühkammer, den man durch differentielles Wiegen der zerstäubten Standardlösung und des Sprühkammerabflusses erhält. Das über die Sprühkammer hinzugefügte ^{205}Tl wurde als kontinuierlicher interner Standard verwendet, um die Detektordrift zu kompensieren.

Diese Quantifizierungsmethode wurde hier deshalb verwendet, da Prozeduren wie die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie (IDMS, engl. isotope dilution mass spectrometry) oder die Standardaddition aus den folgenden Gründen nicht angewendet werden konnten: ^{209}Bi ist monoisotopisch, und daher ist IDMS nicht möglich; $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ ist instabil und daher schwer für die Standardaddition zugänglich.

4.4.13 Kreatininbestimmung

Die Bismut-Konzentrationen aller Urinproben wurden auf ihre Kreatinin-Konzentrationen bezogen. Die Bestimmung des Kreatinins erfolgte mittels eines ADVIA[®] Chemistry System 1650 (Bayer Healthcare, Leverkusen). Die Grundlage des photometrischen Verfahrens ist die Reaktion des Kreatinins mit Pikrinsäure unter alkalischen Bedingungen. Hierbei ist die Bildungsgeschwindigkeit des farbigen Komplexes proportional zur Kreatinin-Konzentration (JAFFE 1886; TIETZ 1995).

4.5 Qualitätssicherung

4.5.1 Bestimmung und Einstellung der Helium-Volumenströme

Die Bestimmung der Helium-Volumenströme des Gaschromatographen und der Purge-Einheit erfolgten durch 7-fach-Bestimmung mittels eines Seifenblasenzählers, der ein geeichtes Volumen von 100 ml besaß. Hierbei entsprachen 30 Skaltenteile (SKT) des GC-Rotameters einem Helium-Volumenstrom von 36 ml/min und 30 SKT der Purge-Einheit einem Helium-Volumenstrom von 60 ml/min. Die Überprüfung der Rotameter-Skala erfolgte vor jeder Messung und etwaige Abweichungen wurden sofort korrigiert.

4.5.2 Subboiling-Aufreinigung von HNO_3

Die in der Ultrapurenanalytik eingesetzte HNO_3 (65 %, p.a., Fisher Scientific, Großbritannien) wurde vor der Verwendung mittels eines Quarz-Subboiling-Systems (Maassen GmbH, Reutlingen) durch zweimalige Destillation aufgereinigt.

4.5.3 Reinigung der PFA-Gefäße und Messkolben für die Ultrapurenanalytik

Um die notwendige Reinheit der Proben-Gefäße und der Messkolben für die Ultrapurenanalytik zu gewährleisten, wurden sie jeweils einer Reinigungsprozedur unterzogen.

In den geschlossenen PFA-Gefäßen für den Mikrowellendruckaufschluss wurden zweimal 8 ml HNO_3 (subboiled) aufgeschlossen (Rampe = 15 min, Temperatur = 200 °C, Haltezeit = 10 min) und mit ultrareinem Wasser gespült.

Die verwendeten Messkolben wurden grundsätzlich über Nacht mit HNO_3 (65 %, p.a., Fisher Scientific, Großbritannien) ausgedämpft (Ausdampfapparatur ADA-1, Maassen GmbH, Reutlingen) und anschließend mit ultrareinem Wasser gespült.

4.5.4 Blindwerte, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Bei der Gesamtmetallanalytik von Blut-, Urin- und Fäzesproben *via* ICP-MS nach Mikrowellendruckaufschluss wurde mit jedem Probenrondell von zwölf Proben ein Blindwert angefertigt. Zudem wurden täglich die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NWG und BG) ermittelt. Die Berechnung erfolgte über das 3 σ - bzw. 10 σ -Kriterium. Typische NWG und BG sind in der Tabelle 6-1 (S. 94) dargestellt.

Bei der Bismut-Speziationsanalytik von Atemluft-, Blut- und Fäzesproben mittels LT-GC/ICP-MS wurde jeden Tag vor Messbeginn und nach jeder stärker belasteten Probe ein Blindwert gemessen. Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte in jedem Messzyklus.

4.5.5 Homogenisierung und Repräsentativität der Stuhlproben

Bei der unter 4.1 (S. 46) beschriebenen Probandenstudie konnten die Fäzesproben wegen der zu geringen Probenmenge und der daraus resultierenden fehlenden Repräsentativität nicht in die Massenbilanz einbezogen werden. Daher wurden sämtliche Fäzesproben der zweiten Studie (4.2 S. 48) quantitativ gesammelt und unter Einhaltung der Kühlkette bei -196 °C mittels einer Kryomühle (Freezer Mill 6850, Spex CertiPrep, Metuchen, USA) homogenisiert.

4.5.6 Gesamtmetallanalytik

Die Validierung der Gesamtmetallbestimmungen erfolgte mittels zertifizierter Referenzmaterialien (SeronormTM Trace Elements in Whole Blood/Urine, Levels 1 und 2, SERO AS, Billingstad, Norwegen). Auf jedem Probenrondell wurde ein der Matrix entsprechendes Referenzmaterial mit vorbereitet. Weiterhin wurde von allen Proben eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Da für die Fäzesproben kein zertifiziertes Referenzmaterial verfügbar war, wurde mit jedem Probenrondell analysierter Fäzesproben eine zertifizierte Blutprobe aufgeschlossen. Zur Homogenitätsüberprüfung der gemahlenen Fäzesproben wurde jedes Aliquot einer Fäzesprobe aufgeschlossen, um anhand der Standardabweichung der Gesamtprobe eine Aussage über die Homogenität treffen zu können.

4.5.7 Speziesanalytik von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Alle Atemluftproben wurden dreifach analysiert. Der quantitative Transfer der Blutgase wurde durch wiederholtes Purgen ($n = 2$) ausgewählter Blutproben überprüft. Zudem wurde von allen Blutproben eine Doppelbestimmung vorgenommen.

Die Fäzesproben wurden ebenfalls wiederholt gepurgt ($n = 2$), um den quantitativen Transfer der Gase sicherzustellen. Weiterhin wurde jedes nach der Homogenisierung abgefüllte Aliquot einer Fäzesprobe analysiert.

4.5.8 Probennahme und Probenlagerung

Mit Ausnahme der Atemluftproben wurden alle Proben lichtgeschützt und gekühlt vom Probennahmeort unter Einhaltung der Kühlkette ins Analytiklabor transportiert und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Die Atemluftproben wurden lediglich lichtgeschützt transportiert und entweder sofort gemessen oder in Kühlfallen gesammelt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

5 Auswertung und Ergebnisse

5.1 Analytische Methoden

5.1.1 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ via GC/EI-MS/ICP-MS

Die Identifizierung des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erfolgte durch die Analyse eines $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standards durch simultane Messung des Massenspektrums mittels EI-MS und des Elementsignals mittels ICP-MS mit Hilfe der von KÖSTERS ET AL. (2005) entwickelten GC/EI-MS/ICP-MS.

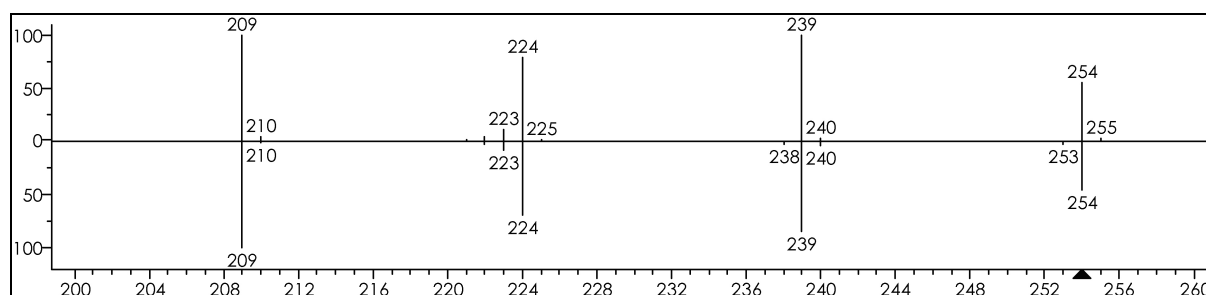


Abbildung 5-1: Massenspektrum des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standards und Bibliotheksspektrums vom untersuchten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (head to tail). $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ wurde in Atemluft-, Blut- und Fäzesproben nach Gabe von kolloidalem Bismutsubcitrat gefunden (m/z (EI-MS): 254 (M^+), 239 (M^+-15), 224 (M^+-30), 209 (M^+-45)).

Das Massenspektrum (Abbildung 5-1) von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (gemessen bei 70 eV) zeigt vier dominante Signale bei $m/z = 254, 239, 224$ und 209 . Während $m/z = 254$ das Molekülion repräsentiert, werden die anderen Signale durch den sukzessiven Verlust der drei Methylgruppen des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erzeugt. Simultan wurde mittels ICP-MS die Massenspur $m/z = 209$ für ^{209}Bi detektiert, um den Metallanteil der metallorganischen Verbindung $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ nachzuweisen.

5.1.2 Bestimmung der Retentionszeit von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Der *via* GC/EI-MS/ICP-MS charakterisierte $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standard wurde zur Bestimmung der Retentionszeit von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ *via* LT-GC/ICP-MS verwendet. Nach einer Fünffachbestimmung wurde eine Retentionszeit des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ von $307,1 \pm 5$ s in der Massenspur $m/z = 209$ für ^{209}Bi bestimmt. Im Folgenden wurde dieses Signal durch Retentionszeitenvergleich zur Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Atemluft-, Blut und Stuhlproben verwendet (Abbildung 5-2).

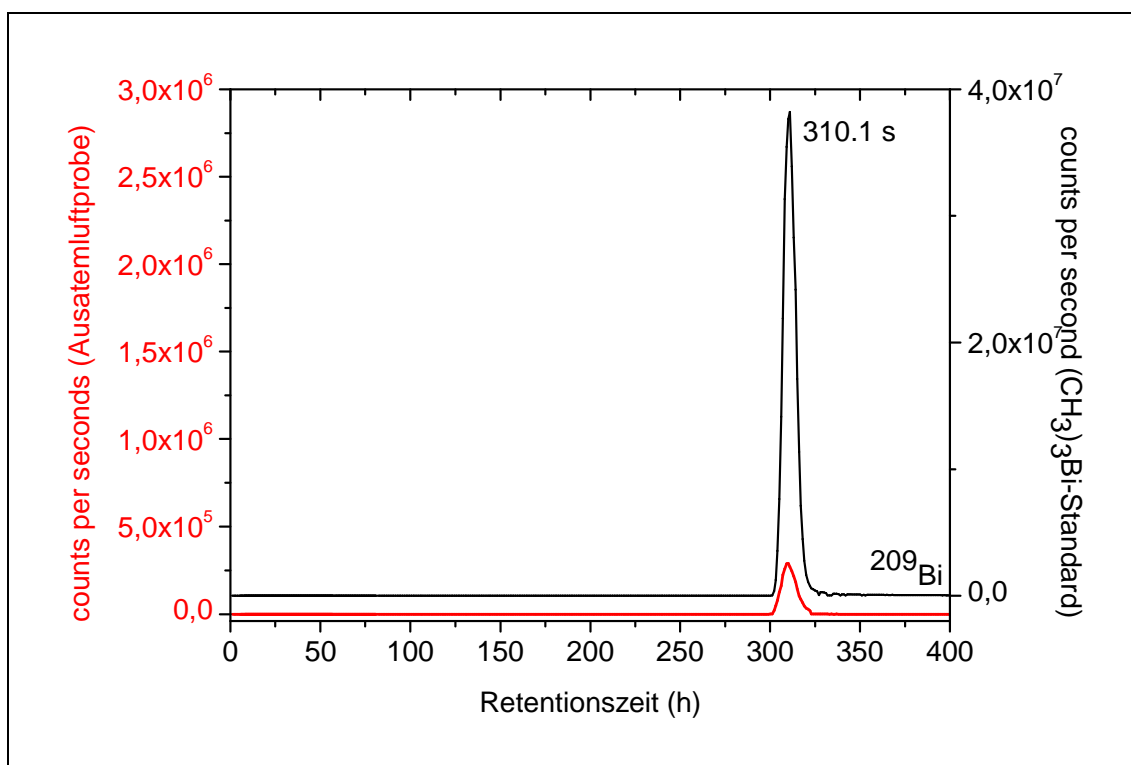


Abbildung 5-2: Vergleich der Retentionszeiten einer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -haltigen Probe (Atemluft, linke y-Achse, rot) und dem $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standard (rechte y-Achse, schwarz).

5.2 Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora

5.2.1 Bismut-Konzentrationen in Blutproben nach der Bismutgabe

Bei der Analyse der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut nach der Aufnahme des Bismut-subcitrats wurden für alle Probanden ähnliche Konzentrationsprofile erhalten. In den Leerproben aller Teilnehmer konnte kein Bismut vor der Bismutgabe detektiert werden. Typischerweise stiegen die Bismut-Konzentrationen im Blut innerhalb der ersten Stunde nach Bismutgabe sehr schnell an (Abbildung 5-3), um dann mit einer Halbwertszeit von ca. $1,6 \pm 0,7$ h (Mittelwert) bzw. 1,4 h (Median) abzufallen.

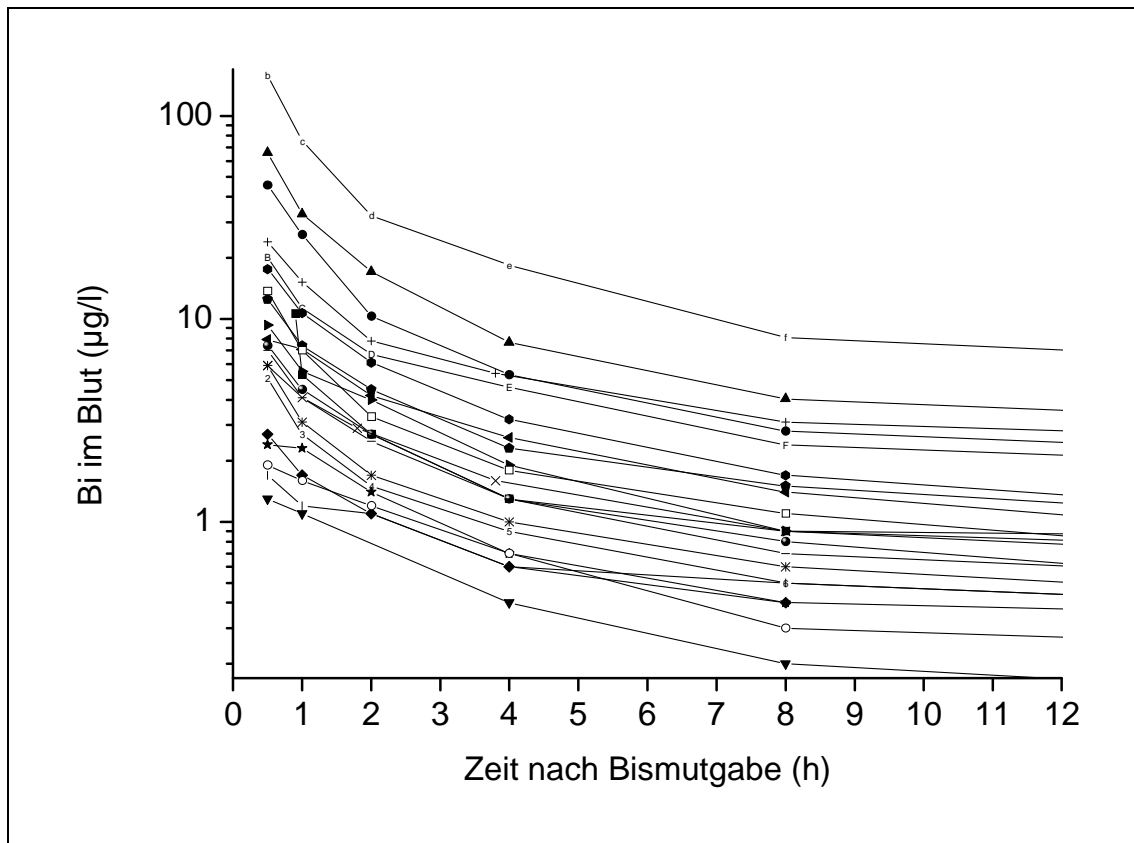


Abbildung 5-3: Profile der Gesamtbismut-Konzentrationen der Studienteilnehmer

Hierbei wurde eine signifikante Variation in den maximalen Bismut-Konzentrationen der Probanden beobachtet, wobei die Konzentrationsmaxima im Bereich von 1,3 bis 158,8 µg/l (Median = 7,9 µg/l) lagen. Nach mehr als 12 Stunden war nur eine geringe Änderung in den Bismut-Konzentrationen zu beobachten.

5.2.2 Bismut-Konzentrationen in Urinproben und renale Eliminierung nach der Bismutgabe

Insgesamt wurden 0,03-1,2 % (Median = 0,09 %; 0,06-2,51 mg, Median = 0,19 mg) des resorbierten Bismuts renal während des Studienzeitraums eliminiert. 68 ± 17 % (Median = 63 %) des resorbierten Bismuts wurde innerhalb der ersten 12 Stunden nach Bismutgabe, meist mit dem ersten Urin, ausgeschieden (Abbildung 5-5).

Weiterhin wurde eine hohe interindividuelle Variation bei den renalen Ausscheidungsmaxima (Höhe und Zeit) mit maximalen Bismut-Konzentrationen im Intervall von 0,02 bis 128 mg/l (Median = 0,26 mg/l) beobachtet. zugehörigen Urinvolumina, welches mit der Masse des aufgenommenen Bismuts in Beziehung gesetzt wurde.

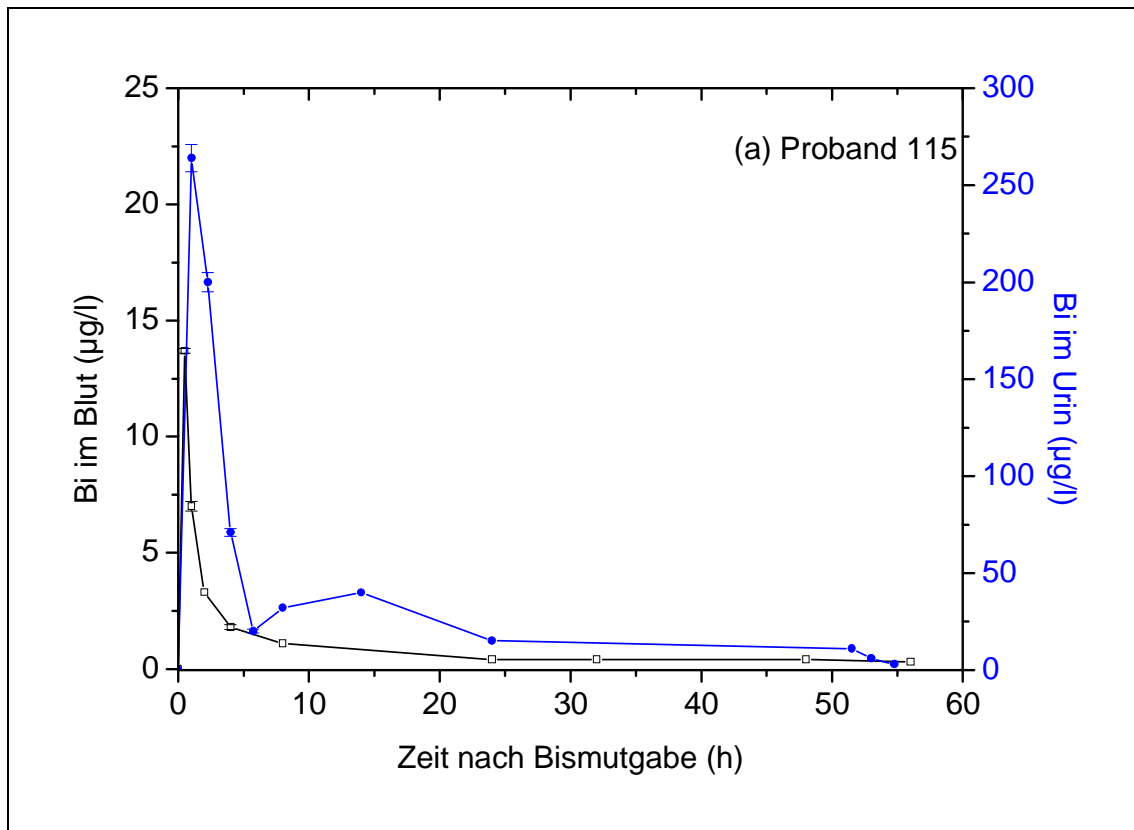


Abbildung 5-4: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut (linke y-Achse, schwarz) mit den Bismut-Konzentrationen im Urin (rechte y-Achse, blau). Proband 115 eliminiert den überwiegenden Teil des resorbierten Bismuts mit dem ersten Urin nach der Bismutgabe.

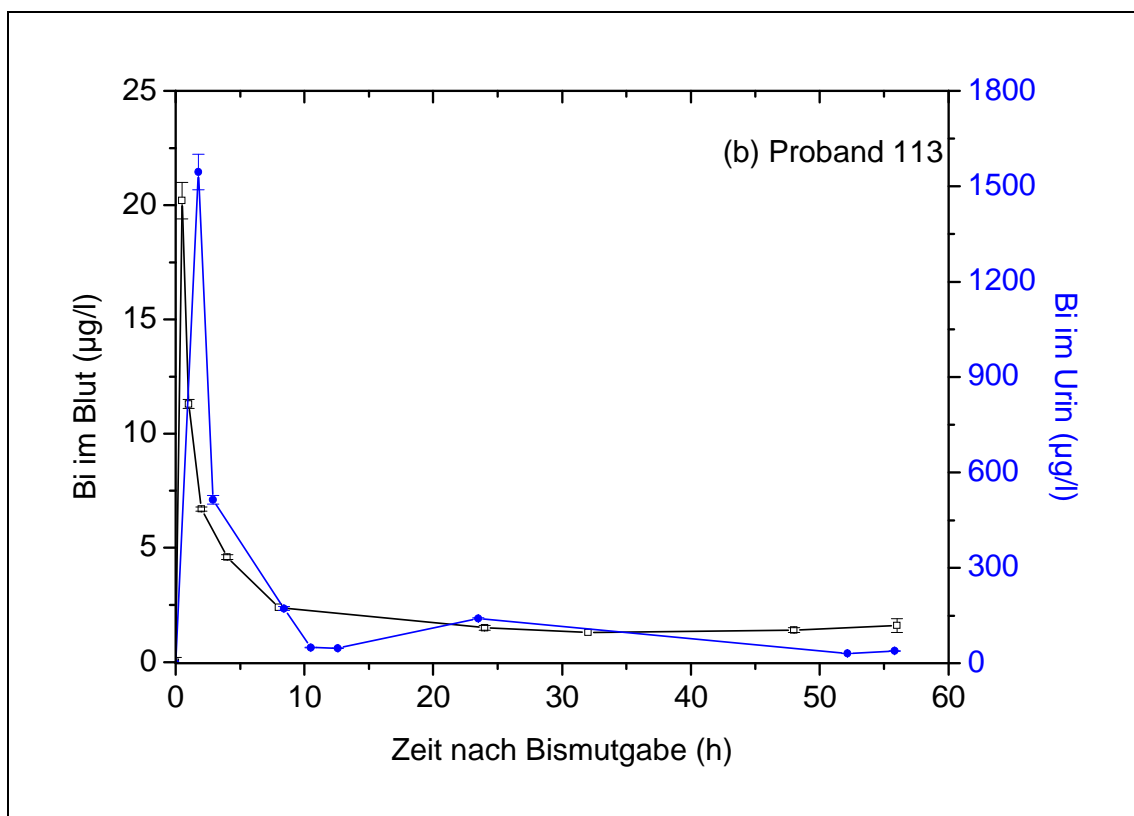


Abbildung 5-5: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut (linke y-Achse, schwarz) mit den Bismut-Konzentrationen im Urin (rechte y-Achse, blau). Proband 113 eliminiert den überwiegenden Teil des resorbierten Bismuts mit dem ersten Urin nach der Bismutgabe.

Die Berechnung des renal ausgeschiedenen Bismuts erfolgte durch die Multiplikation der gemessenen Bismut-Konzentrationen im Urin mit den zugehörigen Urinvolumina, welches mit der aufgenommenen Bismutmasse in Beziehung gesetzt wurde. Eine Übersicht zum renal eliminierten Bismut ist in Tabelle 11-4 (S. 140) dargestellt.

Die Kreatininwerte im Urin lagen im Bereich von 8,5-377,9 mg/dl. Die Korrelation zu den zugehörigen Bismut-Konzentrationen zeigte keine Auffälligkeiten.

5.2.3 Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben nach der Bismutgabe

Die Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben betrugen 0,06 bis 2,36 g/kg (Feuchtgewicht, Median = 0,59 g/kg). Da die Fäzesproben nicht vollständig von den Probanden geliefert und die dazugehörigen Massen weder genau bestimmt noch dokumentiert wurden, erfolgte die Berechnung des fäkal eliminierten Bismuts durch die Subtraktion des exhalierten und renal eliminierten von der Gesamtmasse des oral eingenommenen Bismuts unter Vernachlässigung der Disposition im menschlichen Körper. Unter dieser Annahme werden mehr als 99 % über die Fäzes ausgeschieden.

5.2.4 Nachweis von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Atemluft- und Blutproben nach der Bismutgabe

$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ wurde mindestens in einer Probe aller teilnehmenden Probanden nachgewiesen. Die Anzahl der Studienteilnehmer, bei denen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ zu bestimmten Zeitpunkten in Atemluft- und Blutproben bestimmt wurde, ist in Tabelle 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1: Anzahl der Probanden, bei denen zu spezifischen Zeitpunkten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ nachgewiesen wurde. $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ war in mindestens einer Probe jedes Studienteilnehmers enthalten.

Zeit nach Bismutgabe (h)	0	0,5	1	2	4	8	24	32	48	56
Anzahl der Probanden mit $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Blut	0	0	0	1	4	13	14	13	12	10
Anzahl der Probanden mit $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in der Atemluft	1	-	1	7	17	17	20	-	15	-

Bei der vorhergehenden Pilotstudie (HIRNER ET AL. 2004) wurden die flüchtigen Bismut-Spezies $(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$, CH_3BiH_2 and BiH_3 in Atemluftproben detektiert. Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ war die einzige flüchtige Bismut-Spezies, die in Atemluft- bzw. Blutproben nachgewiesen wurde.

5.2.5 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben nach der Bismutgabe

In den meisten Atemluftproben wurde $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erstmals vier Stunden nach Bismutgabe detektiert. Die Konzentrationsmaxima wurden beim überwiegenden Teil der Probanden nach acht Stunden erreicht und zeigten eine große interindividuelle Variation im Bereich von 0,8-458 ng/m^3 (Median = 23,3 ng/m^3).

Bis zu 5,4 µg (Median = 0,3 µg) des Bismuts wurden in den ersten 48 Stunden *via* Exhalation eliminiert. Dies entspricht 0,03 ‰ (Median = 0,001 ‰) des oral applizierten Bismuts. Die Masse des eliminierten Bismuts entspricht dem Produkt aus der Fläche unter der Konzentrations-vs.-Zeit-Kurve (AUC, engl. area under the curve) und einem angenommenen Atemzeitvolumen von 0,5 m³/h (Atemzeitvolumen in Ruhe). Die Konzentrations-vs.-Zeit-Kurve wurde mittels einer Treppenfunktion im Zeitraum t = 0 bis 48 h integriert, bei der die Sprungzeitpunkte in die Mitte der durch die Messzeitpunkte vorgegebenen Zeitintervalle gelegt wurden. Die hierdurch erhaltenen Datensätze sind in den Tabellen 10-6 und 10-7 (S.142-145) aufgeführt.

5.2.6 (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Blutproben nach der Bismutgabe

Die (CH₃)₃Bi-Konzentrationen wurden auch in Blutproben bestimmt und zwar in einem Bereich bis zu 2,5 pg/ml. Die Konzentrations-vs.-Zeit-Kurven von (CH₃)₃Bi im Blut zeigten grundsätzlich einen ähnlichen Verlauf wie die korrespondierenden Profile von (CH₃)₃Bi in der Atemluft. Zwei typische Profile sind in den Abbildungen 5-6 und 5-7 (S. 70) dargestellt. In 7 von 20 Fällen konnte keine Gegenüberstellung von (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Blut- und Atemluftproben durchgeführt werden, da die (CH₃)₃Bi-Konzentrationen im Blut unterhalb der Nachweisgrenze von 0,01 pg/ml lagen.

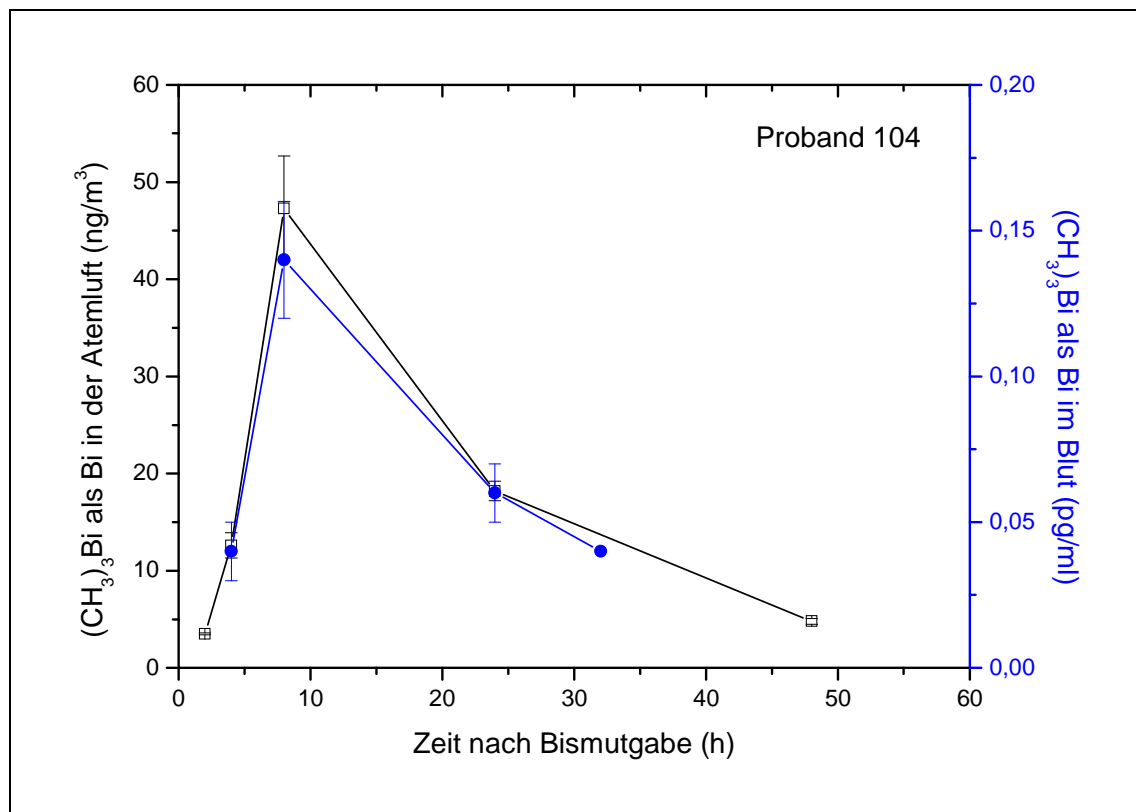


Abbildung 5-6: Gegenüberstellung der (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Atemluft- und Blutproben des Probanden 104. Das (CH₃)₃Bi-Konzentrationsmaximum wurde nach 8 Stunden detektiert.

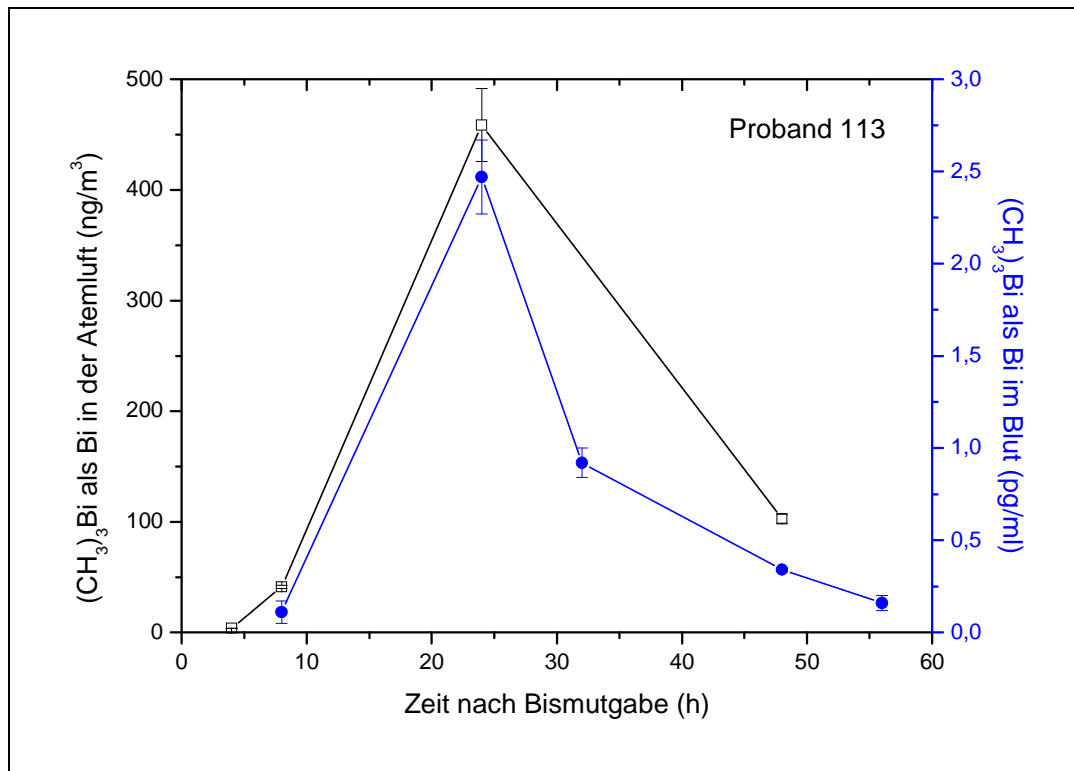


Abbildung 5-7: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluft- und Blutproben des Probanden 113. Das $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaximum wurde nach 24 Stunden detektiert.

5.2.7 Gegenüberstellung der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft

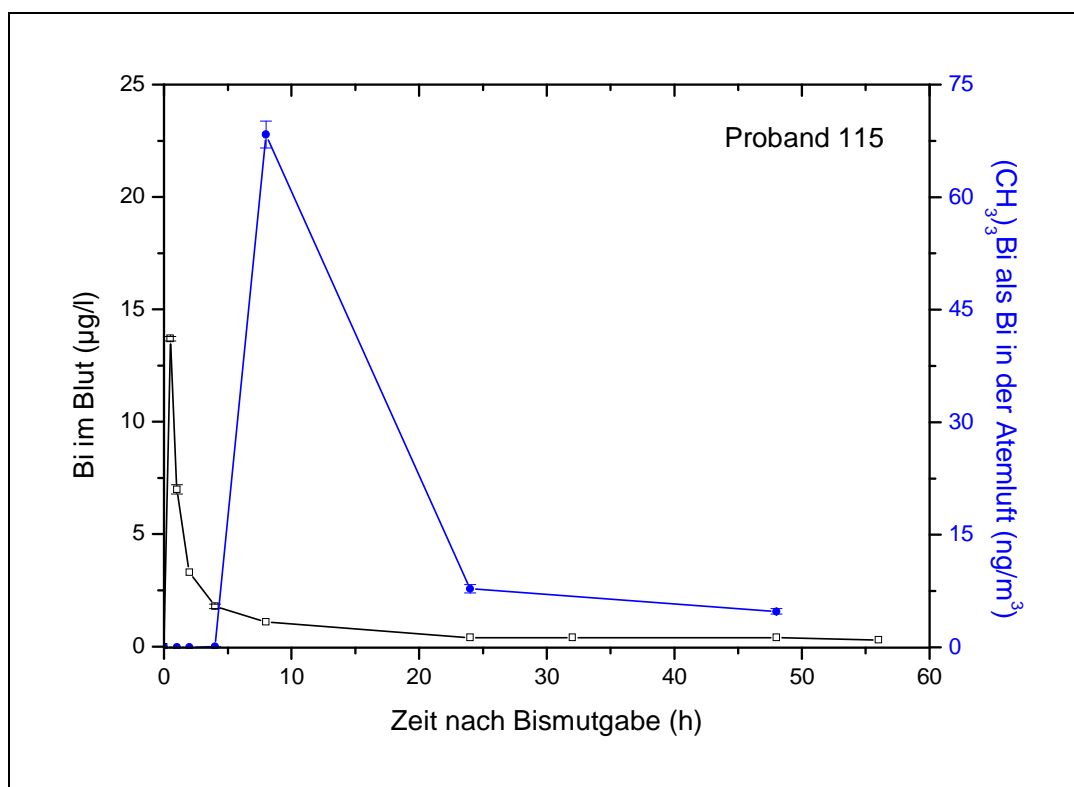


Abbildung 5-8: Gegenüberstellung der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft des Probanden 115. Es war keine direkte Korrelation zwischen beiden Konzentrationsverläufen erkennbar.

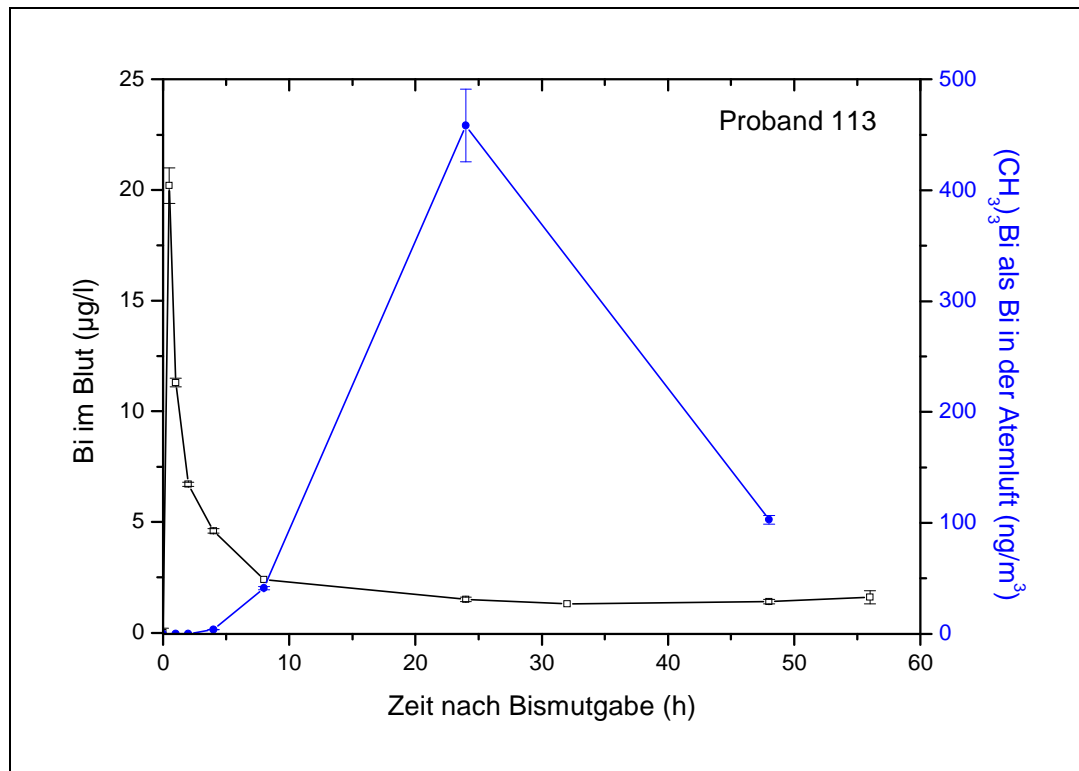


Abbildung 5-9: Gegenüberstellung der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in der Atemluft des Probanden 113. Es war keine direkte Korrelation zwischen beiden Konzentrationsverläufen erkennbar.

Es wurde keine erkennbare Korrelation zwischen den Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut und den (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Atemluft- bzw. Blutproben festgestellt (Abbildung 5-8 und 5-9).

Während die Maxima der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut grundsätzlich innerhalb der ersten Stunde detektiert wurden, lagen die Zeitpunkte der (CH₃)₃Bi-Konzentrationsmaxima im Intervall von 8-24 Stunden nach Bismutgabe.

5.3 Kinetik eines Probanden mit größerer Zeitauflösung nach Ingestion von Bismutsubcitrat

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Studie zur Kinetik nach Gabe von 215 mg bzw. 430 mg Bismut in Form von kolloidalem Bismutsubcitrat dargestellt. Hierbei wurden zweimal jeweils 215 mg und einmal 430 mg Bismut als Einzeldosis verabreicht.

Somit wurden insgesamt für jeden Analyt pro Matrix drei Datensätze erhalten. Eine Ausnahme stellt hierbei das Blut dar. Aufgrund des geringen Erkenntnisgewinns bei der ersten Gabe von 215 mg Bismut wurde bei der erneuten Gabe von 215 mg auf die Beprobung verzichtet.

5.3.1 Bismut-Konzentrationen in Blutproben eines Probanden nach der Bismutgabe

Die Analyse der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut eines Probanden nach der Aufnahme von zwei verschiedenen Dosen Bismut (215 mg bzw. 430 mg Bismut) in Form von kolloidalem Bismutsubcitrat lieferte zwei ähnliche Konzentrationsprofile. In den Leerproben beider Versuchsreihen wurde kein Bismut vor der Bismutgabe detektiert. Nach der Bismutgabe erfolgte ein schneller Anstieg der Bismut-Konzentrationen im Blut auf 2,2 µg/l (215 mg Bismut) bzw. 5,0 µg/l (430 mg Bismut) innerhalb von 0,3 h bzw. 0,7 h, um dann mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1,3$ h bzw. $t_{1/2} = 2,7$ h abzufallen (Abbildung 5-10).

Acht Stunden nach der Bismutgabe veränderte sich die Bismut-Konzentration im Blut nicht mehr deutlich und blieb über den gesamten Studienzeitraum auf einem Niveau von ca. 0,3 µg/l (215 mg Bismut) bzw. 0,5 µg/l (430 mg Bismut).

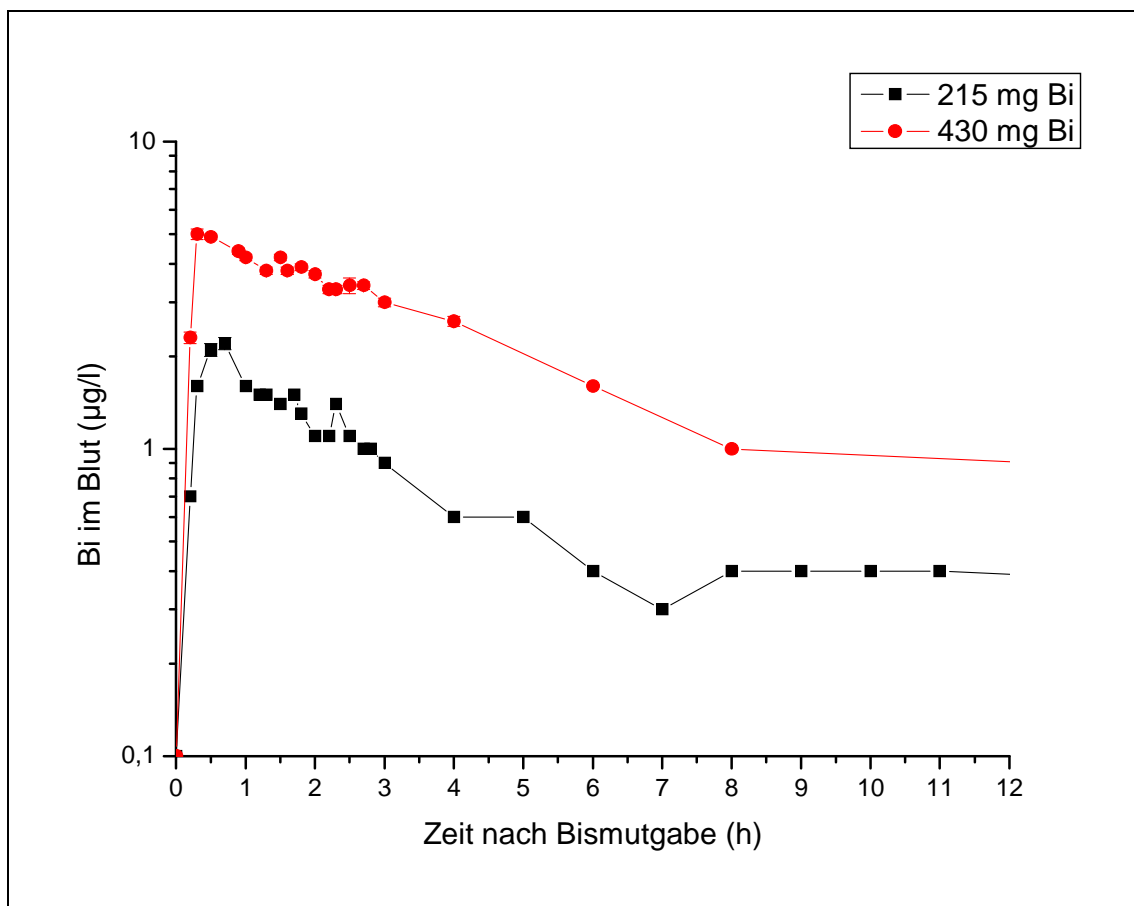


Abbildung 5-10: Profile der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut eines Probanden nach Gabe von 215 mg (schwarz) bzw. 430 mg Bismut (rot).

5.3.2 Bismut-Konzentrationen im Urin und renale Bismut-Eliminierung nach der Bismutgabe

Nach Ingestion von 215 mg bzw. 430 mg Bismut in Form von CBS wurden 0,05 % und 0,02 % (103 µg bzw. 38 µg von 215 mg Bismut) bzw. 0,1 % (430 µg von 430 mg Bismut) des resorbierten Bismuts renal eliminiert. In allen drei Fällen wurden 50-53 % des resorbierten

Bismuts innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Bismutgabe mit dem Urin ausgeschieden. Die Berechnung des renal eliminierten Bismuts erfolgte hierbei analog zu 5.2.2 (S. 66). Vor der Bismutgabe lagen die Bismut-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Die beobachteten Bismut-Konzentrationsmaxima im Urin zeigten eine hohe Variation und lagen bei 39,0 $\mu\text{g/l}$ bzw. 18,9 $\mu\text{g/l}$ für eine Dosis von 215 mg und bei 310,6 $\mu\text{g/l}$ für eine Dosis von 430 mg Bismut (Abbildung 5-12). Nach mehr als 90 Stunden nach der Bismutgabe konnte Bismut noch in Urinproben detektiert werden. Die Kreatininwerte im Urin lagen im Bereich von 8,5–377,9 mg/dl. Die Korrelation zu den zugehörigen Bismut-Konzentrationen zeigte keine Auffälligkeiten.

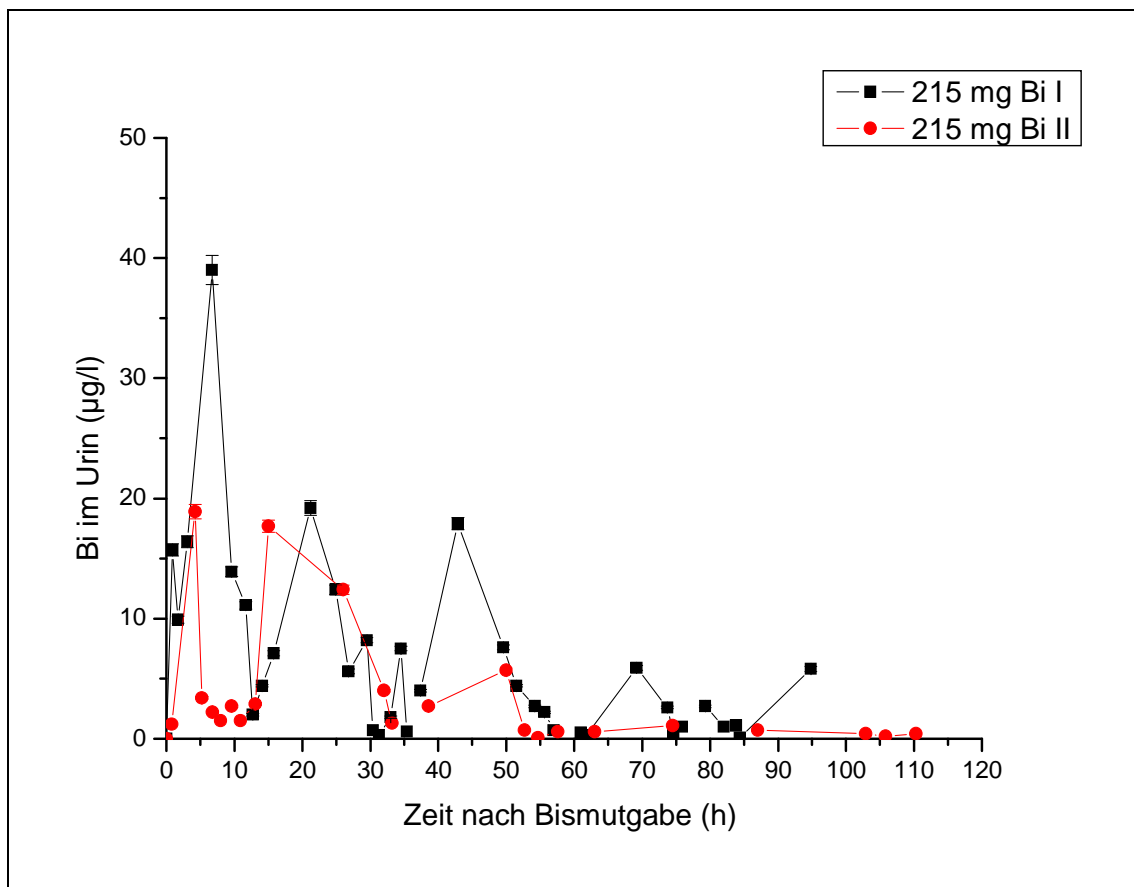


Abbildung 5-11: Bismut-Konzentrationen in Urinproben nach Gabe von 215 mg Bismut

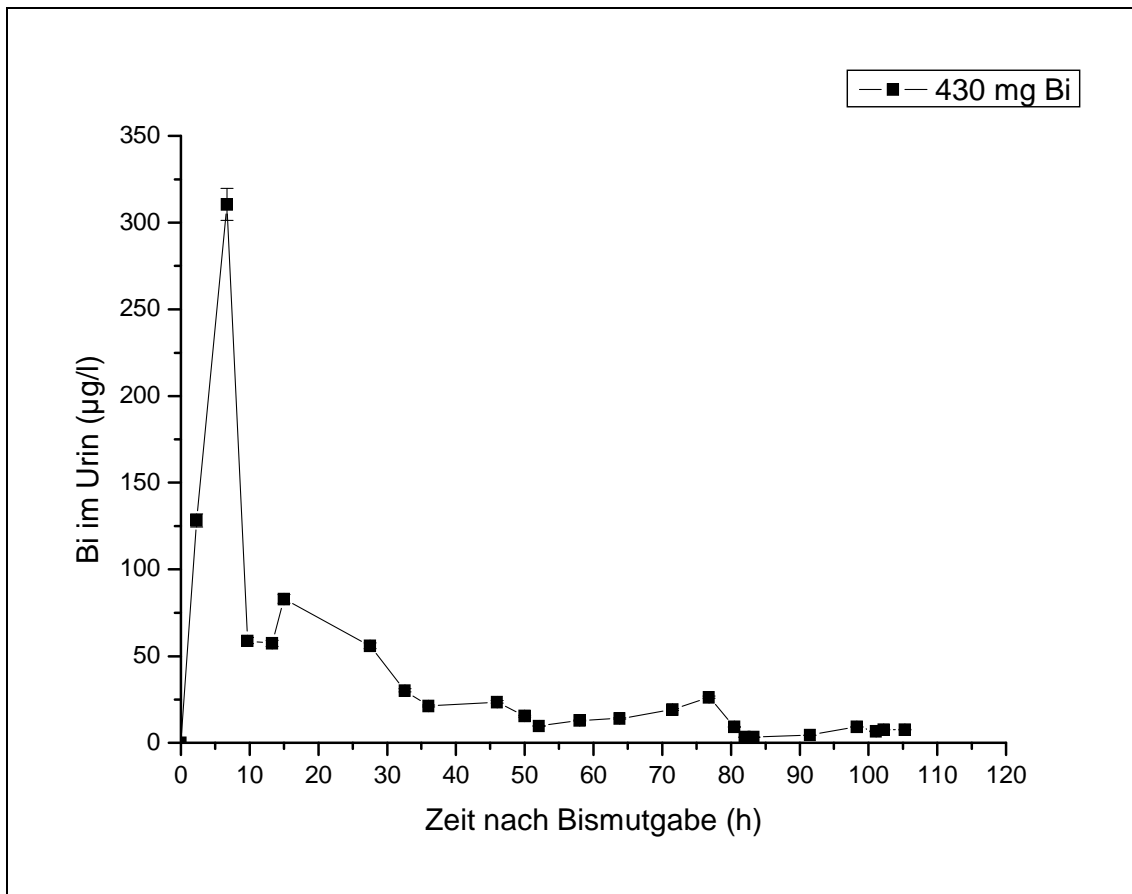


Abbildung 5-12: Bismut-Konzentrationen in Urinproben nach Gabe von 430 mg Bismut

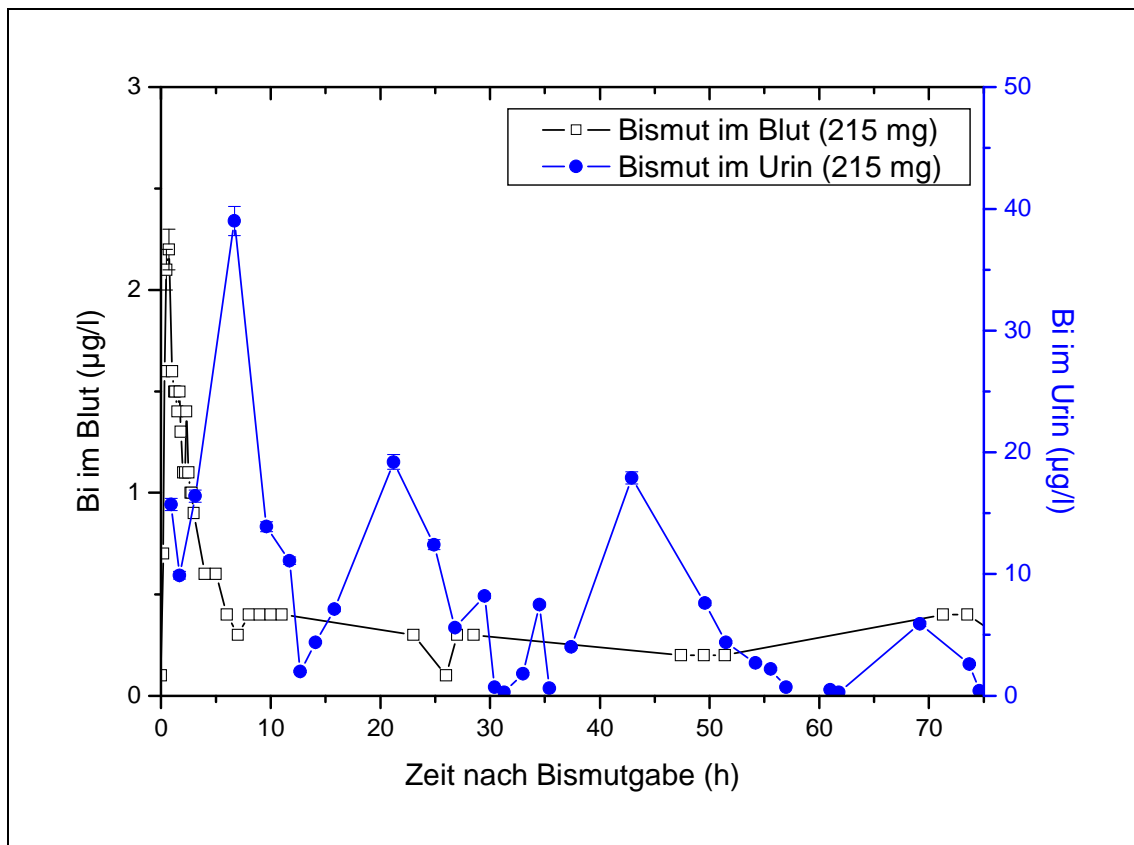


Abbildung 5-13: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut (linke y-Achse, schwarz) mit den Bismut-Konzentrationen im Urin (rechte y-Achse, blau) nach Gabe von 215 mg Bismut

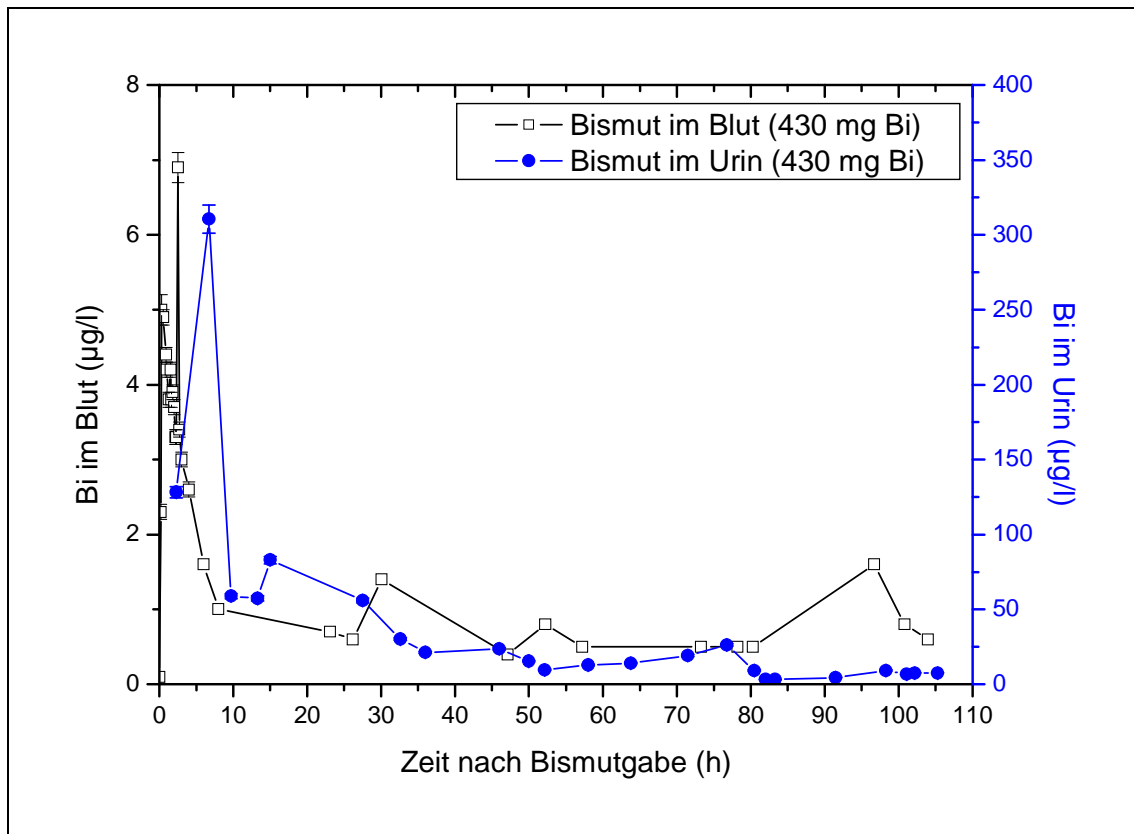


Abbildung 5-14: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut (linke y-Achse, schwarz) mit den Bismut-Konzentrationen im Urin (rechte y-Achse, blau) nach Gabe von 430 mg Bismut

In Abbildung 5-13 und Abbildung 5-14 sind die Gegenüberstellungen der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den zugehörigen Bismut-Konzentrationen im Urin dargestellt. Hier ist der Zusammenhang zwischen Resorption im Blut und renaler Eliminierung sehr gut zu erkennen. Nach der Bismutgabe steigt zunächst die Bismut-Konzentration im Blut stark an; die nachfolgende renale Eliminierung erfolgt in mehreren Schritten, meist mit einem Konzentrationsmaximum im Morgenurin.

Eine vollständige Datenübersicht zu den Bismut-Konzentrationen in den Urinproben ist in den Tabellen 10-10 und 10-11 (S. 151-153) gegeben.

5.3.3 Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben und fäkale Bismut-Eliminierung nach der Bismutgabe

Über den Fäzes wurden während des Studienzeitraums 91-93 % eliminiert. Bei der Gabe von 215 mg Bismut wurden 198 mg bzw. 199 mg, bei der Gabe von 430 mg Bismut wurden 392 mg innerhalb von fünf Tagen mit den Fäzes ausgeschieden. Die Berechnung der eliminierten Bismutmasse erfolgte durch Multiplikation der Bismut-Konzentrationen in den Fäzesproben mit der zugehörigen Masse der quantitativ gesammelten und homogenisierten Fäzesprobe.

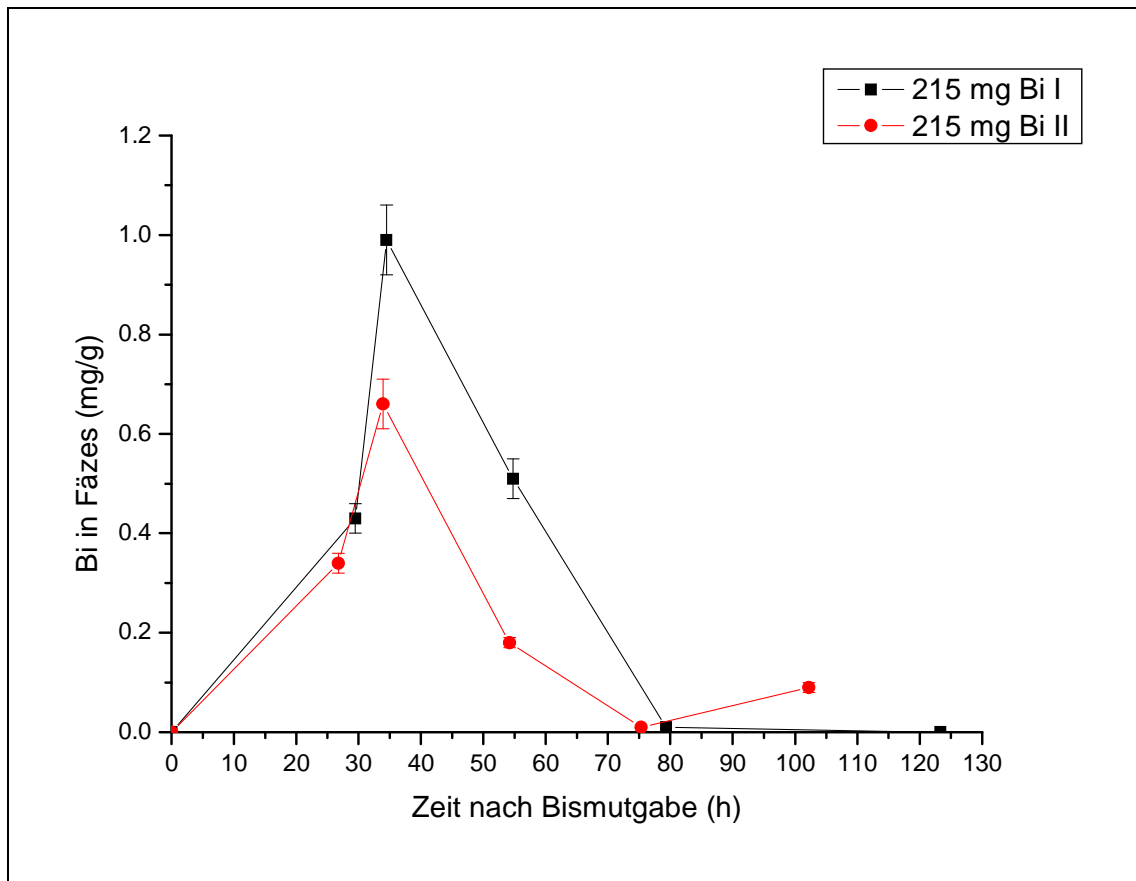


Abbildung 5-15: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut

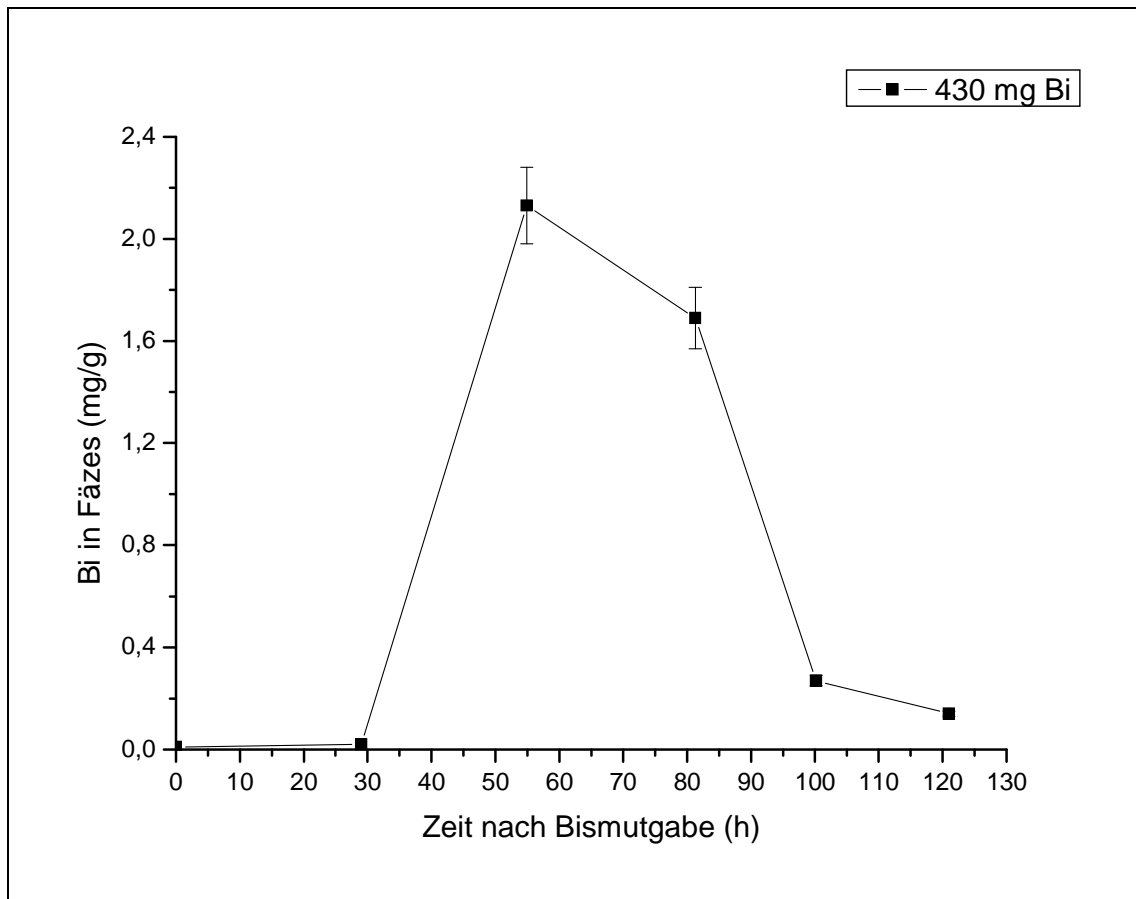


Abbildung 5-16: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut

Die Bismut-Konzentrationsmaxima in den Fäzesproben betrugen 0,99 mg/g bzw. 0,66 mg/g (215 mg Bismut) und 2,13 mg/g (430 mg Bismut), welche nach 34,5 h bzw. 33,9 h und nach 54,9 h erreicht wurden.

5.3.4 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben nach der Bismutgabe

Die Analyse der Atemluftproben nach der Bismutgabe ergab die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsverläufe, die in den Abbildungen 5-17 bis 5-19 dargestellt sind. Vor der Bismutgabe lagen die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Die erste Detektion des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ erfolgte nach 2-4 Stunden. Bei der erstmaligen Gabe von 215 mg Bismut wurde erst ab $t = 5,1$ h mit der Messung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft begonnen, weil der Fokus in den ersten Stunden auf die Probennahme im Blut gerichtet wurde. In allen drei Versuchsreihen wurden mehrere lokale Maxima detektiert, wobei jeweils ein Maximum innerhalb der ersten zehn Stunden und ein weiteres nach 50-60 Stunden erfasst wurde. Zudem wurde bei der ersten Gabe von 215 mg Bismut ein weiteres Maximum nach ca. 30 Stunden, bei der zweiten Gabe zwei weitere Maxima nach ca. 30 und 70 Stunden und bei der Gabe von 430 mg Bismut ein weiteres Maximum nach ca. 100 Stunden detektiert. Das globale Maximum wurde in jedem Versuch nach 50-60 Stunden gemessen. Eine Übersicht der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima ist in Tabelle 5-2 (S. 79) dargestellt.

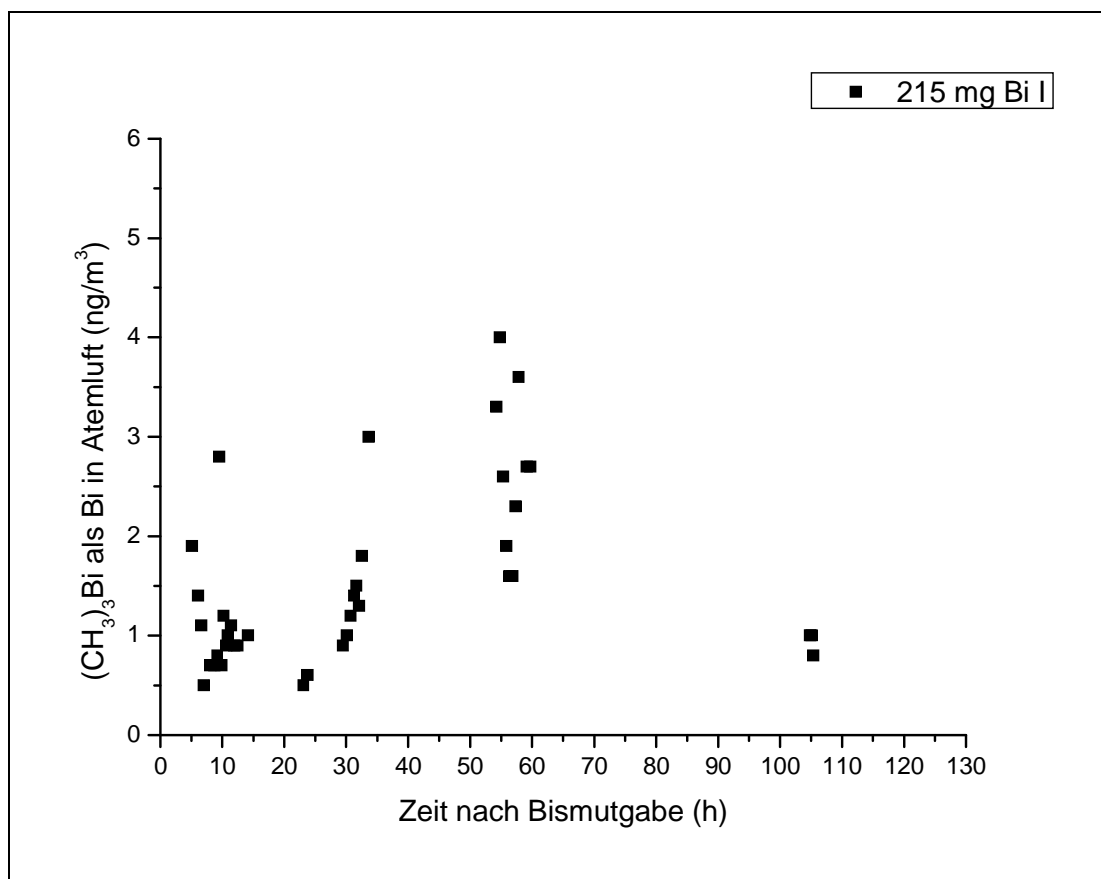


Abbildung 5-17: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch I)

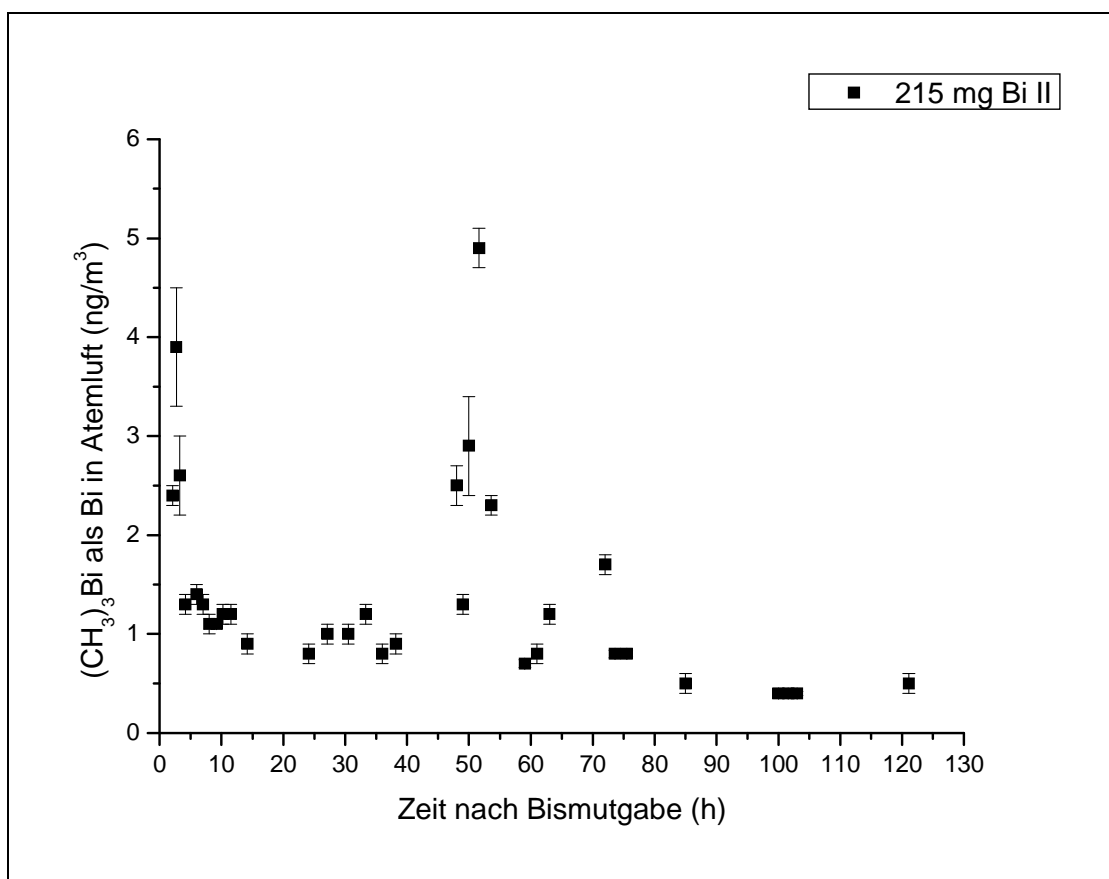
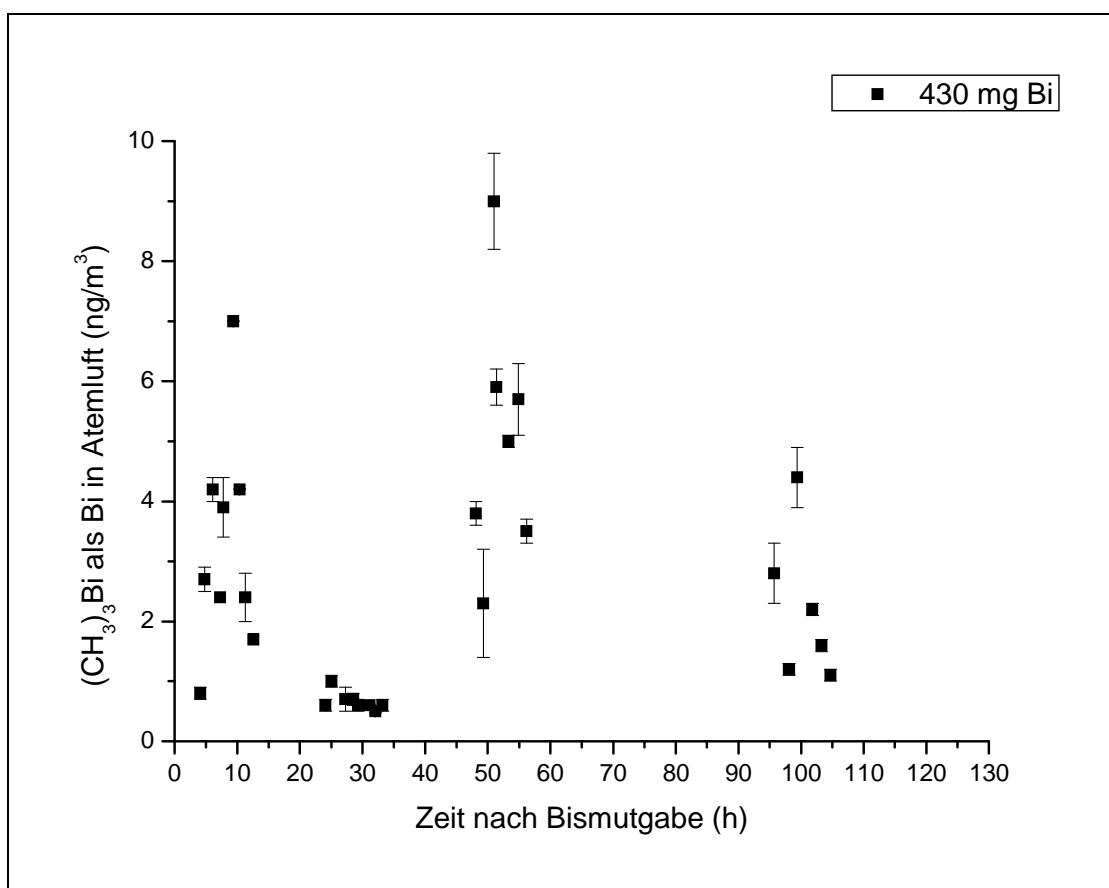
Abbildung 5-18: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch II)Abbildung 5-19: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft nach Gabe von 430 mg Bismut

Tabelle 5-2: Übersicht zu den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Maxima nach Bismutgabe

Bismutdosis	1. Maximum	2. Maximum	3. Maximum	4. Maximum
215 mg (I)	9,5 h; 2,8 ng/m ³	33,6 h; 3,0 ng/m ³	54,8 h; 4,0 ng/m ³	-
215 mg (II)	2,7 h; 3,9 ng/m ³	33,3 h; 1,2 ng/m ³	51,6 h; 4,9 ng/m ³	72,0 h; 1,7 ng/m ³
430 mg	9,4 h; 7,0 ng/m ³	51,0 h; 9,0 ng/m ³	99,4 h; 4,4 ng/m ³	-

Weiterhin wurden in den drei Versuchen 98 ng und 61 ng (215 mg Bismut) bzw. 97 ng (430 mg Bismut) über die Atemluft eliminiert. Diese exhalierten Bismutmassen entsprechen 0,46 ppm und 0,29 ppm bzw. 0,22 ppm des eingenommenen Bismuts, welche analog zu 5.2.5 (S. 68) berechnet wurden.

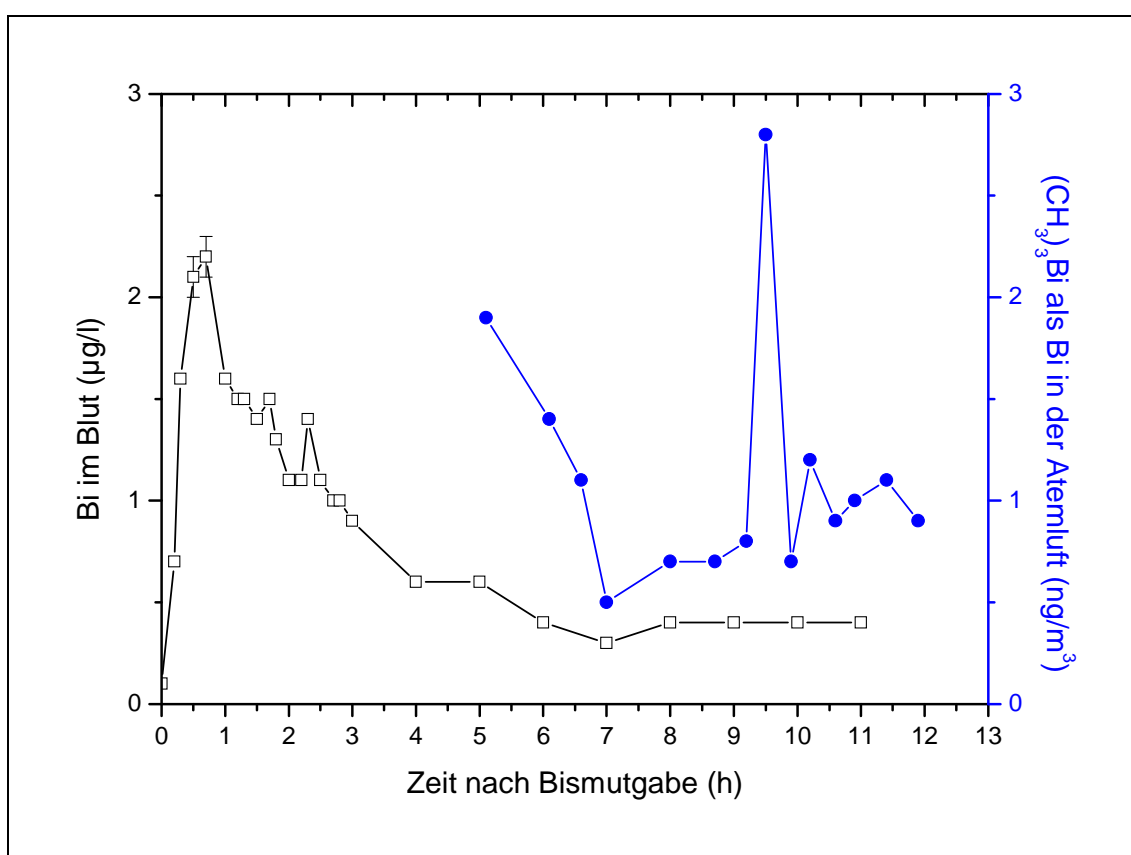


Abbildung 5-20: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft (rechte y-Achse, blau) nach Gabe von 215 mg Bismut

Der vollständige Datensatz der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft ist in den Tabellen 10-13 und 10-14 (S. 154-156) dargestellt.

Die Gegenüberstellungen der Bismut-Konzentrationen im Blut mit den zugehörigen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft ist für die ersten ca. 12 Stunden nach Bismutgabe in den Abbildungen 5-20 und 5-21 dargestellt. In Abbildung 5-21 ist ein um ca. 9 Stunden verzögertes $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaximum, bezogen auf den Zeitpunkt des Bismut-Konzentrationsmaximums, erkennbar. Zwar kann aufgrund der fehlenden Messwerte bis zum

Zeitpunkt $t = 5,1$ h in Abbildung 5-20 keine Aussage für diesen Zeitraum gemacht werden, jedoch deuten die abnehmenden $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen ebenfalls auf einen ähnlichen Verlauf wie in Abbildung 5-21, lediglich um einige Stunden früher, hin. Für den Zeitraum $t > 12$ h konnte keine derartiger Zusammenhang erkannt werden.

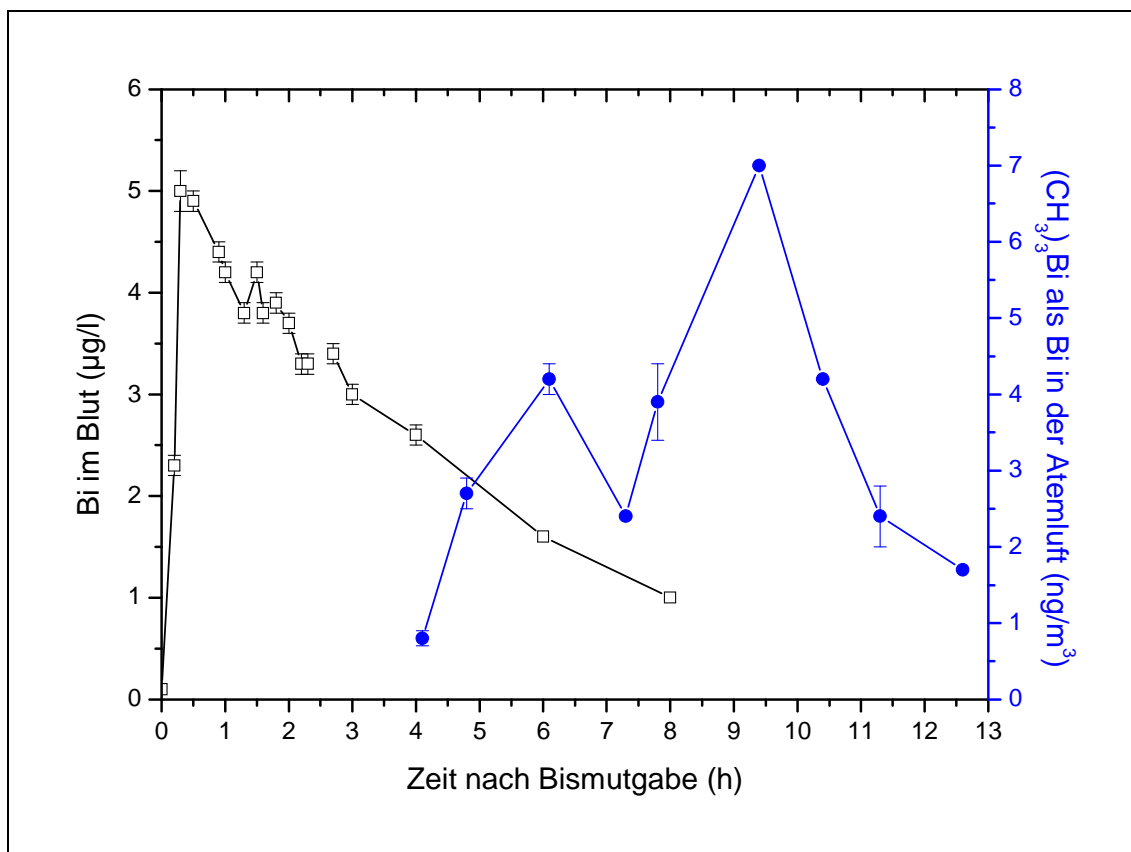


Abbildung 5-21: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen im Blut (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft (rechte y-Achse, blau) nach Gabe von 430 mg Bismut

5.3.5 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben nach der Bismutgabe

Die Bestimmung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen wurde in allen Blutproben durchgeführt. Bei der ersten Gabe von 215 mg Bismut konnte innerhalb der ersten 28 Stunden kein $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Blut nachgewiesen werden. Weiterhin befanden sich die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen im gesamten Beobachtungszeitraum (bis zu 76,3 Stunden) unterhalb der Bestimmungsgrenze von 0,04 pg/ml.

Bei der wiederholten Gabe von 215 mg wurde auf die Beprobung des Bluts verzichtet, da keine quantifizierbaren $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen zu erwarten waren. Auch nach der Gabe einer Einfachdosis von 430 mg Bismut befanden sich die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen im Blut fast ausschließlich unterhalb der Bestimmungsgrenze. Nach 52,2 und 57,2 Stunden konnte die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration zu 0,04 pg/ml bestimmt werden.

Zu diesen Zeitpunkten waren auch die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft am höchsten.

5.3.6 $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach der Bismutgabe

Die Analyse der Fäzesproben nach Ingestion von Bismutsubcitrat ergab die in Abbildung 5-23 dargestellten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsprofile. Vor der Bismutgabe konnte kein $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben nachgewiesen werden. Anschließend erfolgte ein Anstieg auf 1738 ng/kg bzw. 3115 ng/kg (215 mg Bismut) und 5679 ng/kg (430 mg Bismut). Die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima wurden nach ca. 79 und 54 bzw. 100 Stunden erreicht.

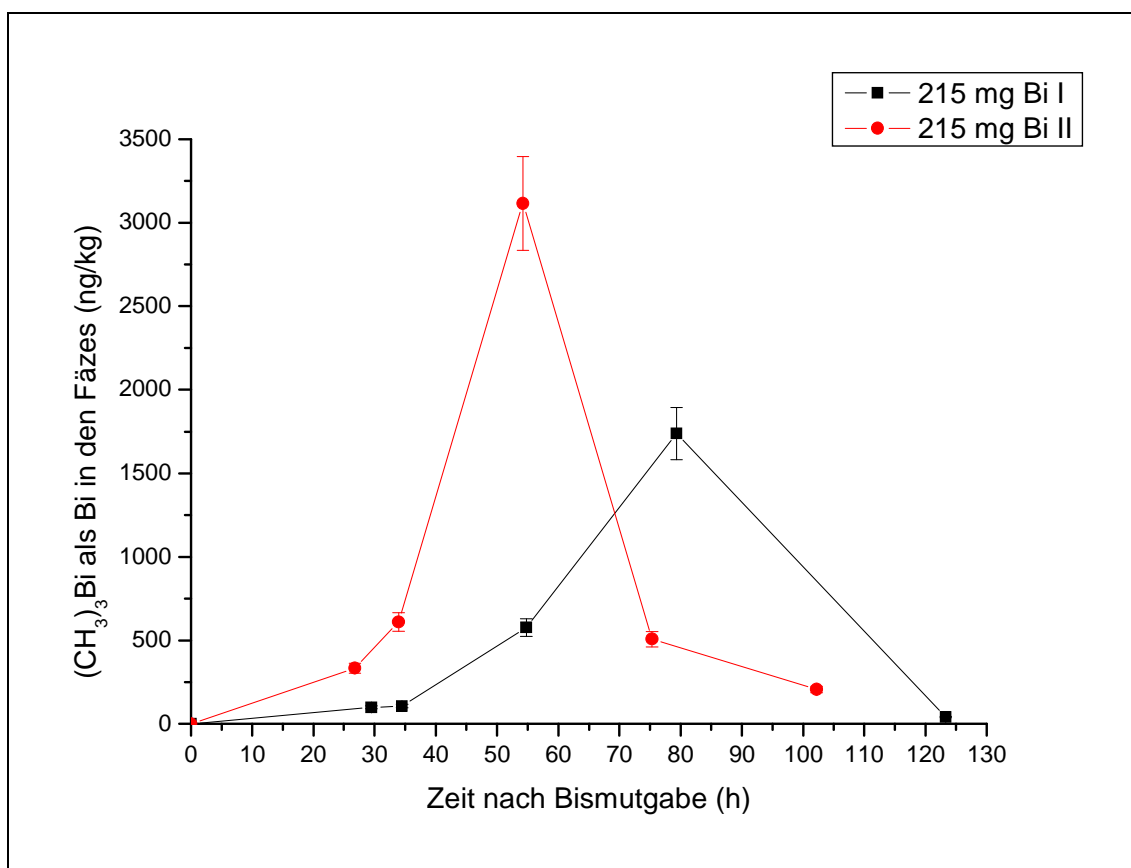
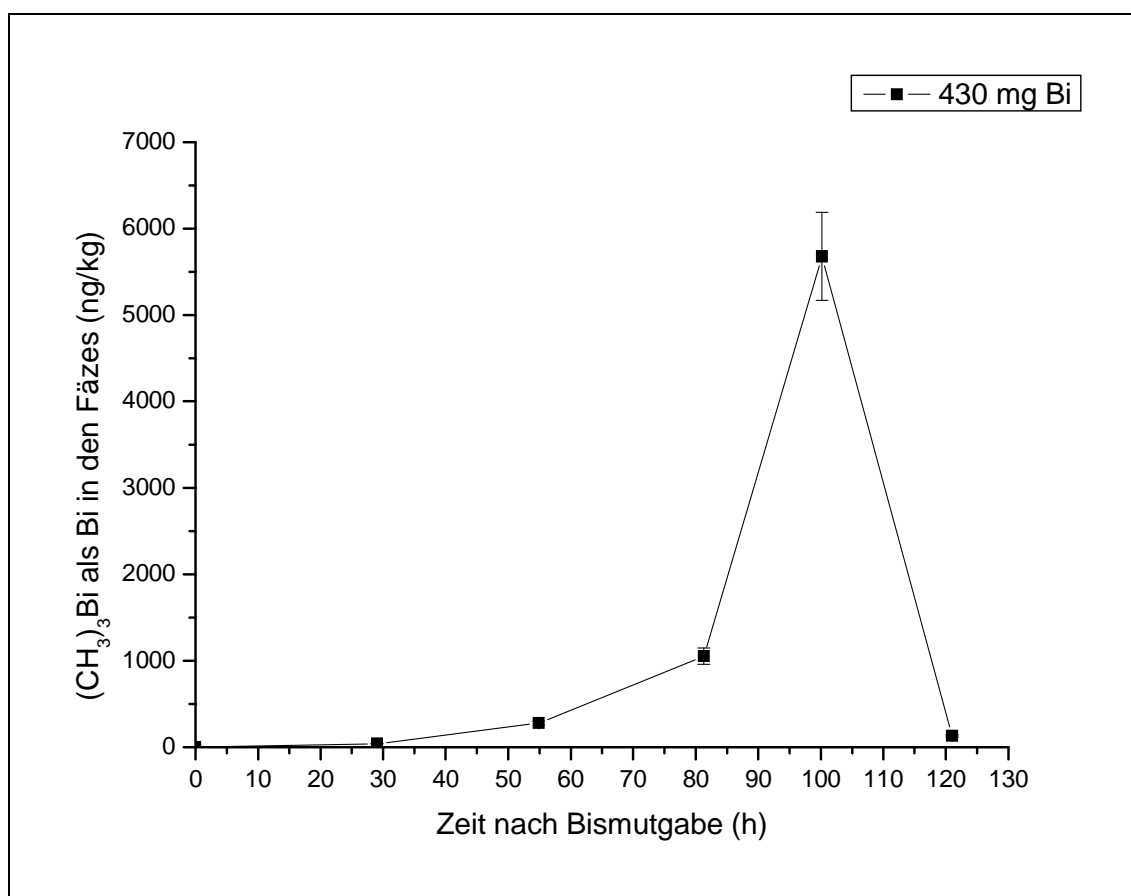
Insgesamt wurden während des Studienzeitraums 525 ng und 936 ng (215 mg Bismut) bzw. 765 ng (430 mg Bismut) als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ über die Fäzes eliminiert.

Dies entspricht 1,8-4,4 ppm der eingenommenen Bismut-Dosis. Die Berechnung des als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ eliminierten Bismuts erfolgte durch Multiplikation der gemessenen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen mit den zugehörigen Massen der homogenisierten Fäzesproben. Die zugehörigen Daten sind in Tabelle 11-16 und Tabelle 11-17 (S. 158) dargestellt.

Die Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen mit den entsprechenden Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben zeigte in allen drei Fällen einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 5-26). Die maximale $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration wurde zeitversetzt um ca. 25-50 Stunden nach dem Bismut-Konzentrationsmaximum erreicht.

Die Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen der Fäzesproben mit den dazugehörigen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft zeigte in den drei untersuchten Fällen drei unterschiedliche Verläufe (Abbildung 5-29). Während bei der ersten Gabe von 215 mg Bismut das absolute Maximum in der Atemluft nicht mit dem absoluten Maximum in den Fäzes korreliert, wird bei der zweiten Gabe von 215 mg Bismut eine Übereinstimmung des absoluten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaximums im Fäzes und der Atemluft beobachtet.

Nach Ingestion von 430 mg Bismut ist hingegen keine Beziehung zwischen den absoluten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima zu erkennen, jedoch wird das $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Maximum der Fäzesproben mit einem lokalen Maximum der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft detektiert.

Abbildung 5-22: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg BismutAbbildung 5-23: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut

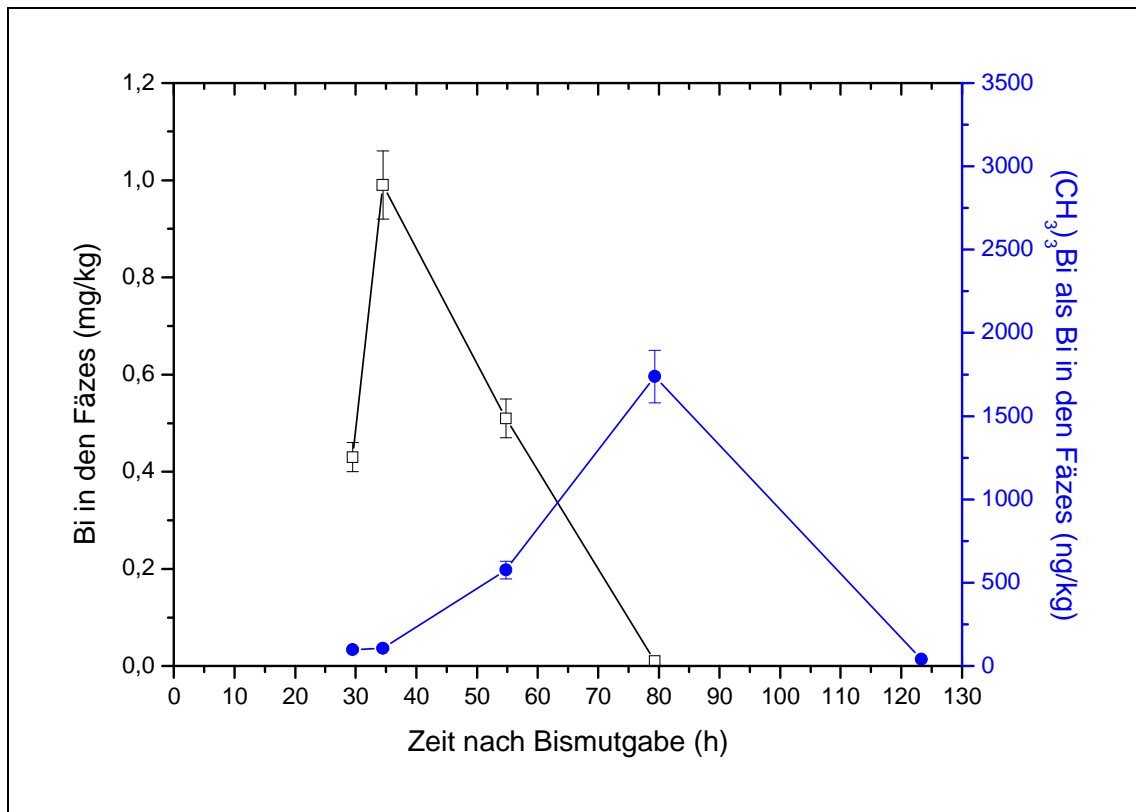


Abbildung 5-24: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen (rechte y-Achse, blau) in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch I).

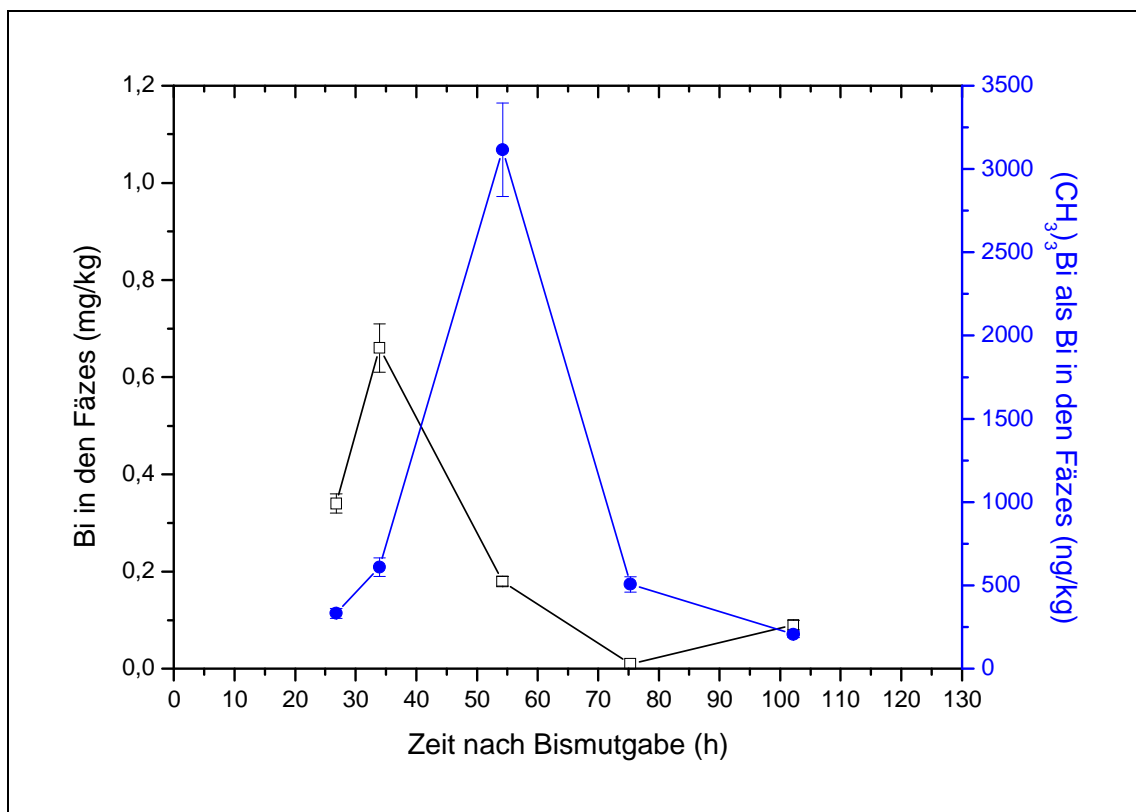


Abbildung 5-25: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen (rechte y-Achse, blau) in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch II).

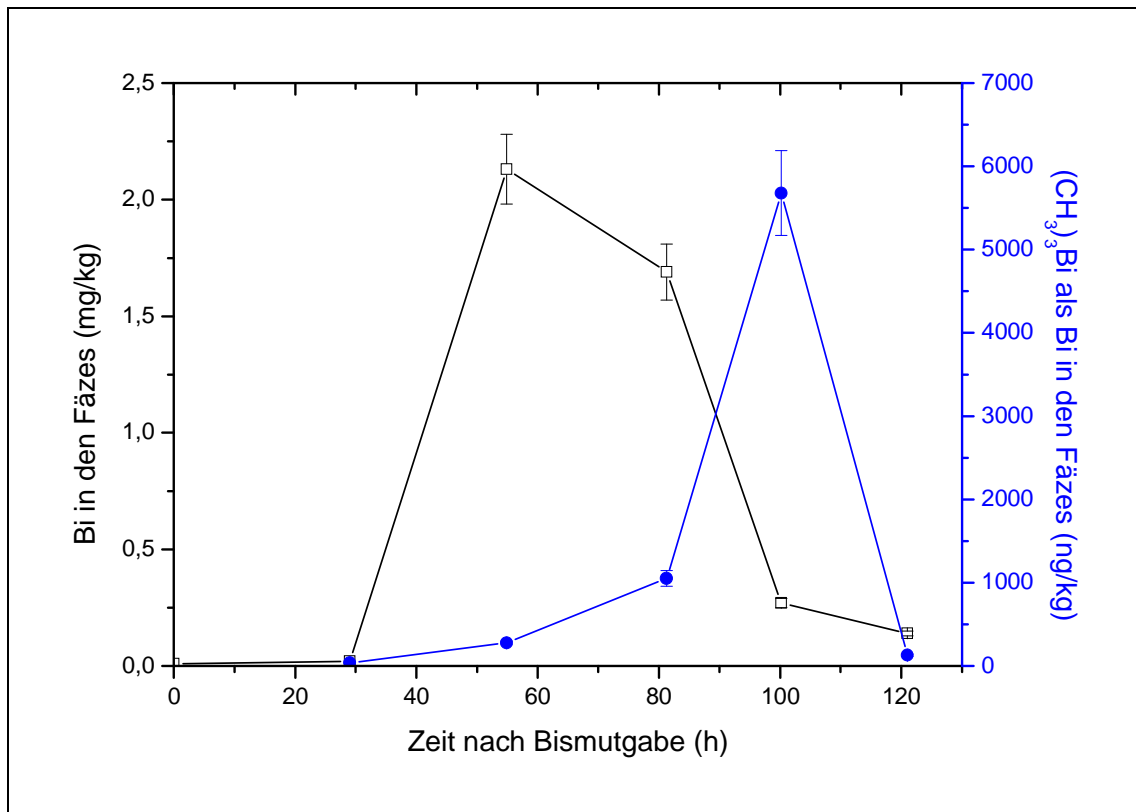


Abbildung 5-26: Gegenüberstellung der Bismut-Konzentrationen (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen (rechte y-Achse, blau) in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut.

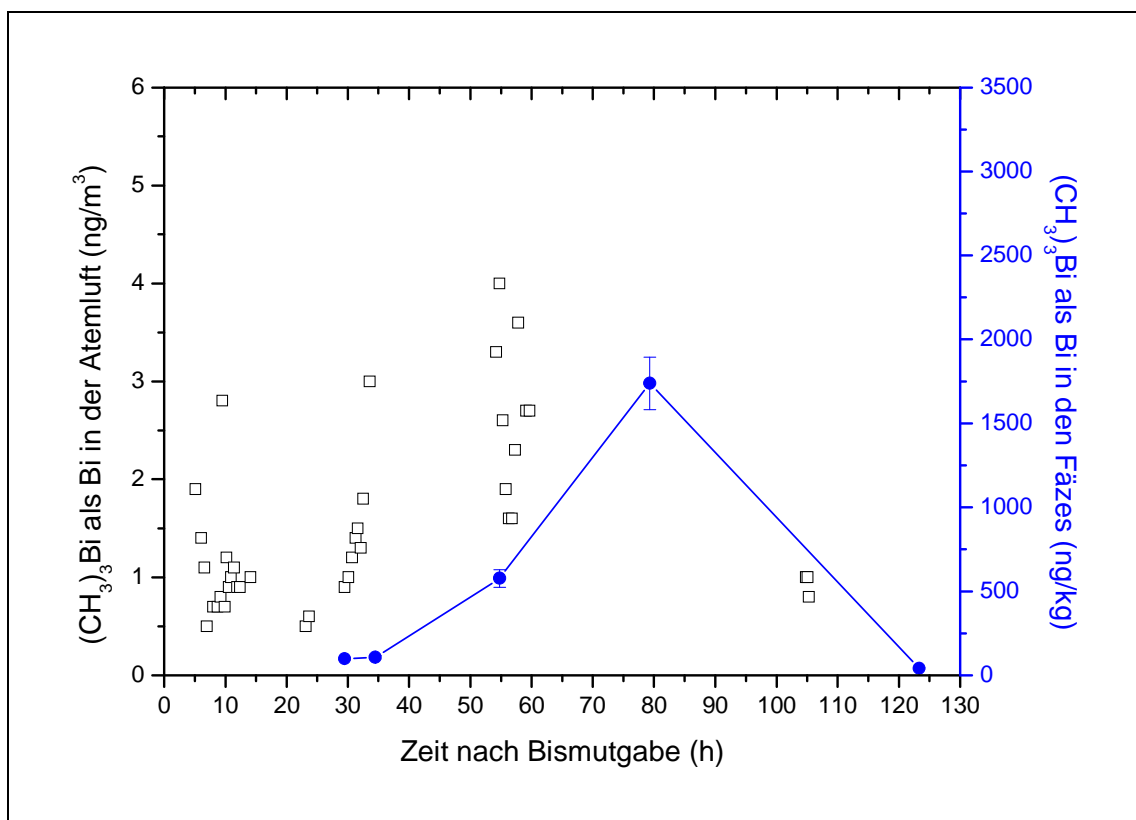


Abbildung 5-27: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen (rechte y-Achse, blau) in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch I)

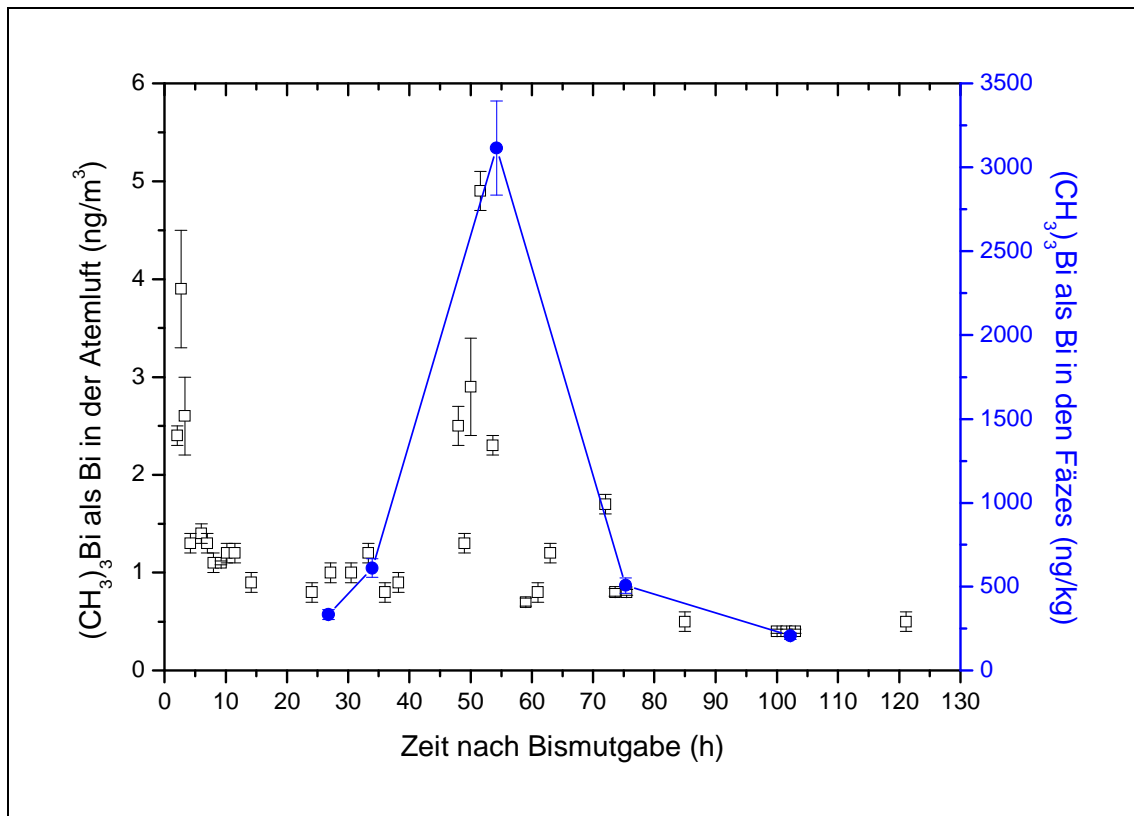


Abbildung 5-28: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen (rechte y-Achse, blau) in Fäzesproben nach Gabe von 215 mg Bismut (Versuch II)

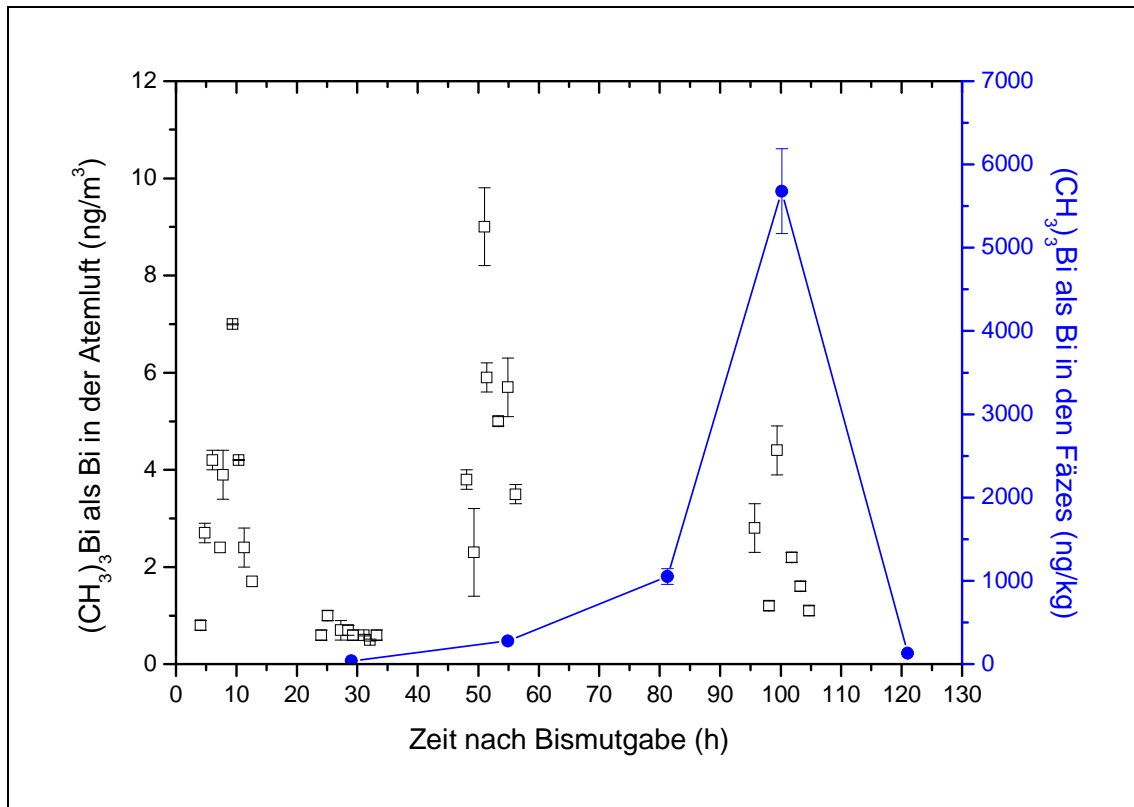


Abbildung 5-29: Gegenüberstellung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft (linke y-Achse, schwarz) mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen (rechte y-Achse, blau) in Fäzesproben nach Gabe von 430 mg Bismut

5.4 Untersuchungen an humanen Hepatozyten zur Bismut-Methylierung

5.4.1 Speziesanalytik von Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien *via* LT-GC/ICP-MS

Im Headspace von HepG2-Zellkulturen konnten nach Inkubation mit kolloidalem Bismut-subcitrat, Bismutcystein oder Bismutglutathion keine flüchtigen Bismut-Spezies detektiert werden. Die Variation der Inkubationszeit auf 1, 2, 4, 8 bzw. 24 Stunden lieferte das gleiche Ergebnis.

5.4.2 Speziesanalytik von Hepatozyten-Kulturen nach Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien und anschließender Ethylierung mittels Natriumtetraethylborat *via* GC/EI-MS/ICP-MS

Im Headspace von 10^6 HepG2-Zellen, die nach Inkubation mit Bismutsubcitrat ethyliert wurden, wurde mittels gaschromatographischer Separierung das unter Abbildung 5-30 dargestellte Chromatogramm erhalten. Hierbei wurden sechs Signale detektiert, von denen vier den cyclischen Siloxanen D3, D4, D5 und D6 zugeordnet wurden und die aus dem verwendeten Entschäumer stammen. Die Signale nach 11,56 min und 12,10 min wurden durch ihr Massenspektrum als Monomethyldiethylbismut ($((\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi})$) und Triethylbismut ($((\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi})$) identifiziert.

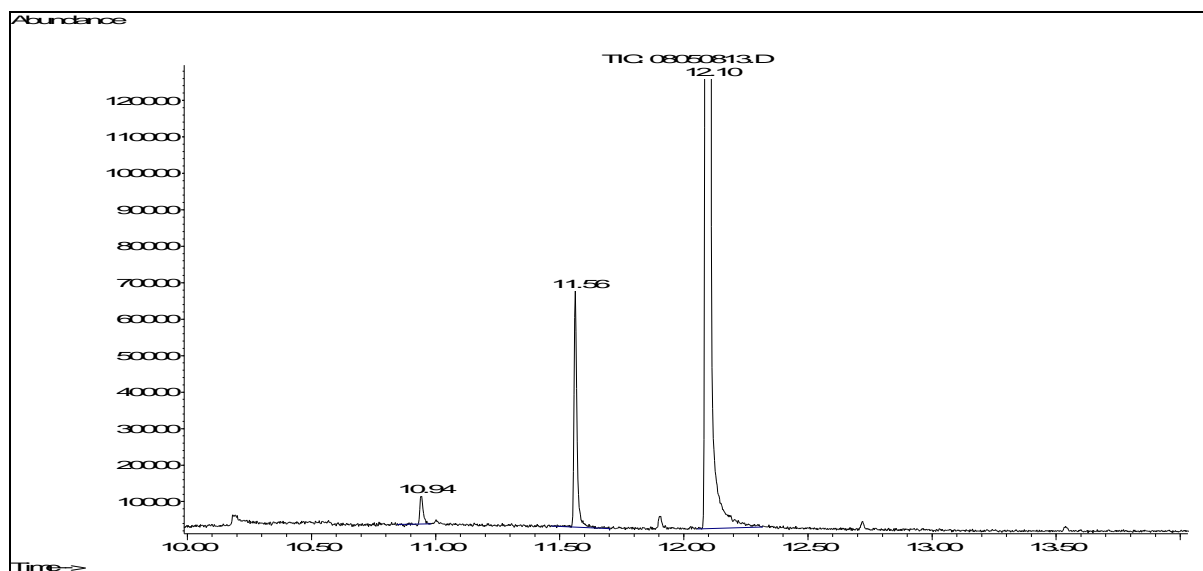


Abbildung 5-30: Chromatogramm des ethylierten Zelllysats nach 24-stündiger Inkubation mit Bismutsubcitrat und Purge&Trap-Probenaufgabe ($t_R = 10,94$ min D3, $t_R = 11,55$ min Monomethyl-diethylbismut, $t_R = 11,94$ min D4, $t_R = 12,10$ min Triethylbismut, $t_R = 12,73$ min D5, $t_R = 13,54$ min D6)

Das Massenspektrum des Monomethyldiethylbismuts (Abbildung 5-31) zeigt vier dominante Signale bei $m/z = 282$, 253, 225 und 209. Während $m/z = 282$ das Molekulation repräsentiert,

werden die anderen Signale durch den sukzessiven Verlust zweier Ethylgruppen und einer Methylgruppe des $(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi}$ erzeugt.

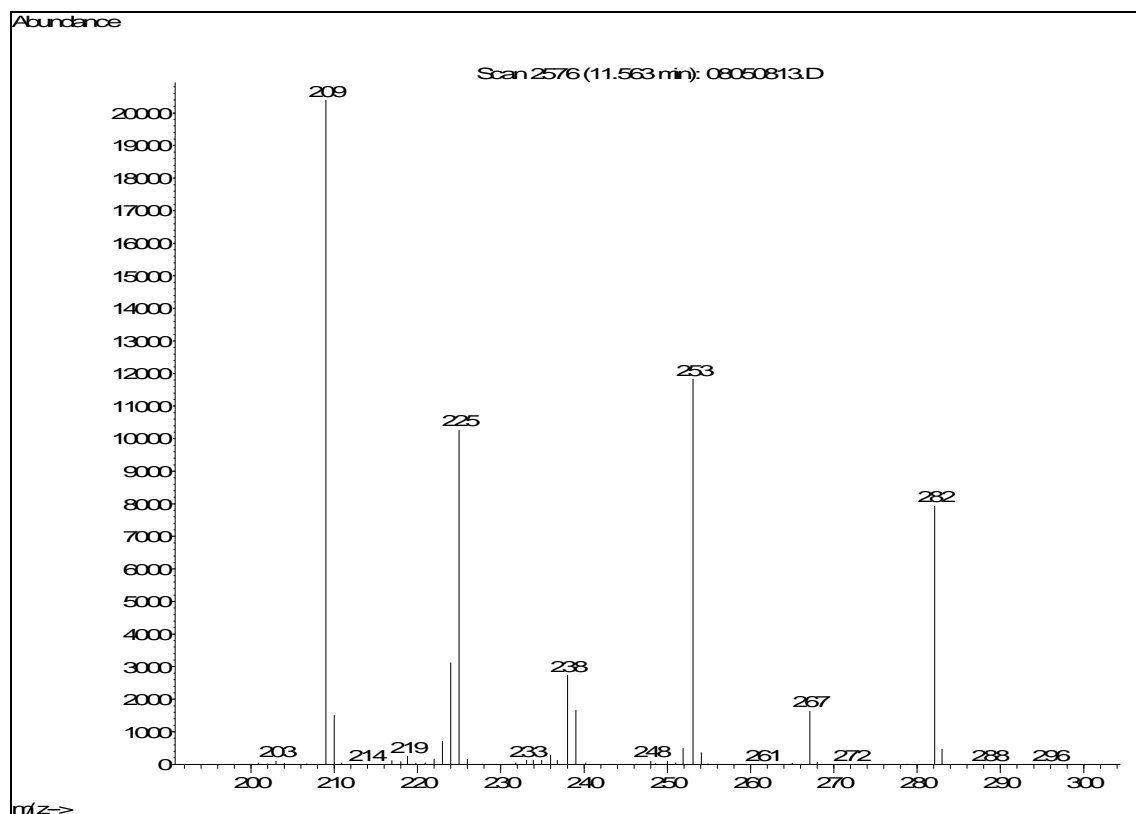


Abbildung 5-31: Massenspektrum von Monomethyldiethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutsubcitrat und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat (m/z (EI-MS): 282 (M^+), 253 (M^+-29), 225 (M^+-57), 209 (M^+-73)).

Das Massenspektrum des Triethylbismuts (Abbildung 5-32) zeigt ebenfalls vier dominante Signale bei $m/z = 296$, 267, 239 und 209. Diese entstehen durch die Detektion des Moleküli-
ons ($m/z = 296$) und der Fragmentionen, die durch die Abspaltung einer, zweier oder aller Ethylgruppen entstehen.

In den Leerproben dieses Versuches konnte weder $(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Bi}$ noch $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{Bi}$ nachgewiesen werden.

Nach Inkubation von 10^6 HepG2-Zellen mit Bismutcystein und anschließender Ethylierung wurde das in Abbildung 5-33 dargestellte Chromatogramm nach gaschromatographischer Trennung des Heaspaces erhalten. Hier sind ebenfalls die vier Signale der cyclischen Siloxane D3, D4, D5 und D6 aus dem Entschäumer, sowie das Signal des Monomethyldiethylbismuts ($t_R = 11,57$ min) und das Triethylbismut-Signal ($t_R = 12,09$ min) zu sehen. Die zugehörigen Massenspektren der Bismut-Verbindungen sind im Anhang als Abbildung 11-7 (S. 161) und Abbildung 11-8 (S. 162) angefügt.

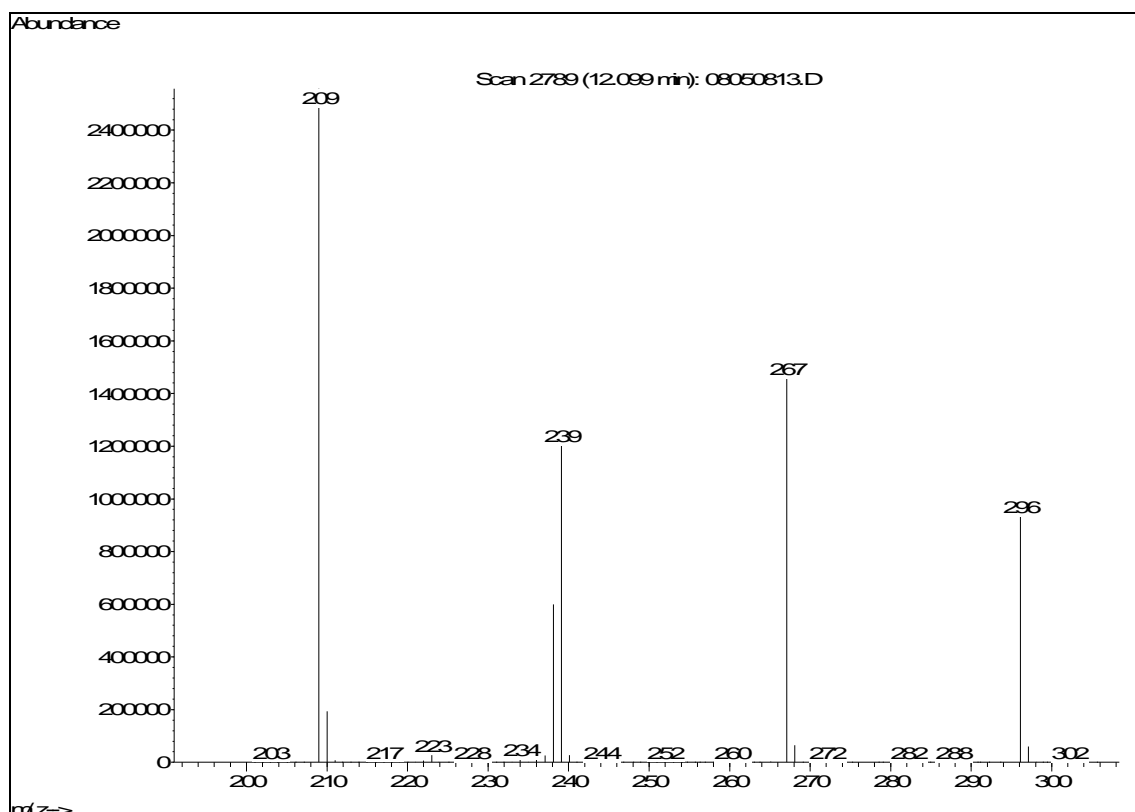


Abbildung 5-32: Massenspektrum von Triethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutsubcitrat und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat (m/z (EI-MS): 296 (M^+), 267 (M^+-15), 239 (M^+-30), 209 (M^+-45)).

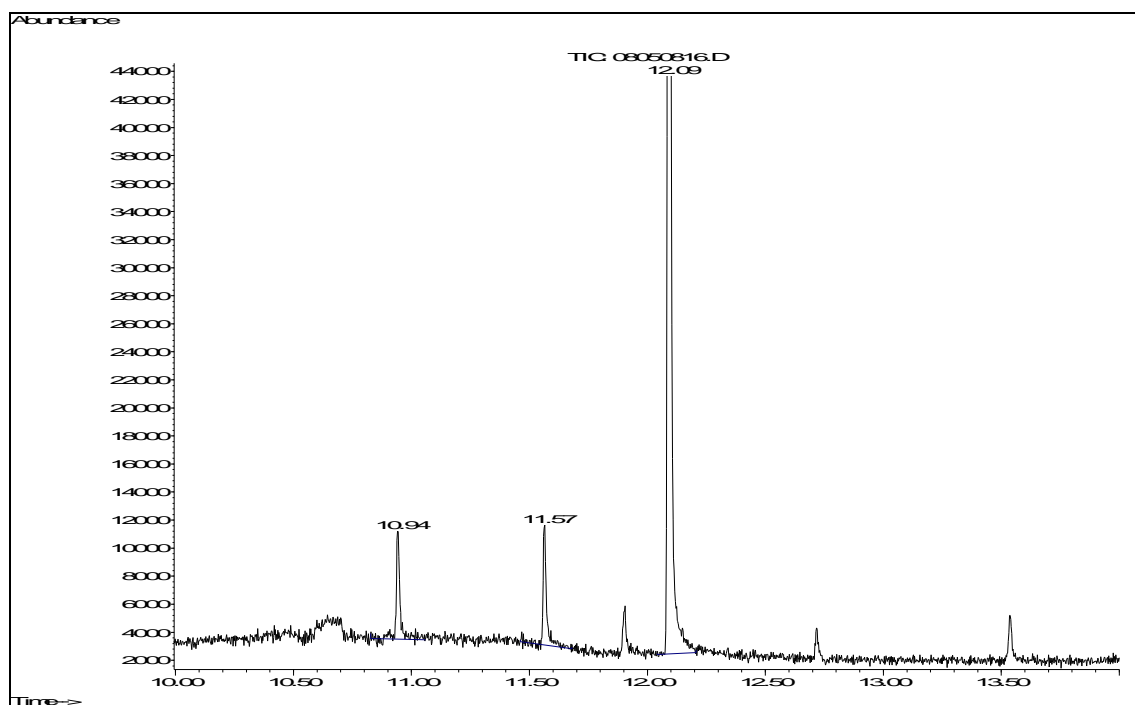


Abbildung 5-33: Chromatogramm des ethylierten Zelllysats nach 24-stündiger Inkubation mit Bismut-cystein und Purge&Trap-Probenaufgabe ($t_R = 10,94$ min D3, $t_R = 11,57$ min Monomethyldiethyl-bismut, $t_R = 11,94$ min D4, $t_R = 12,08$ min Triethylbismut, $t_R = 12,73$ min D5, $t_R = 13,54$ min D6).

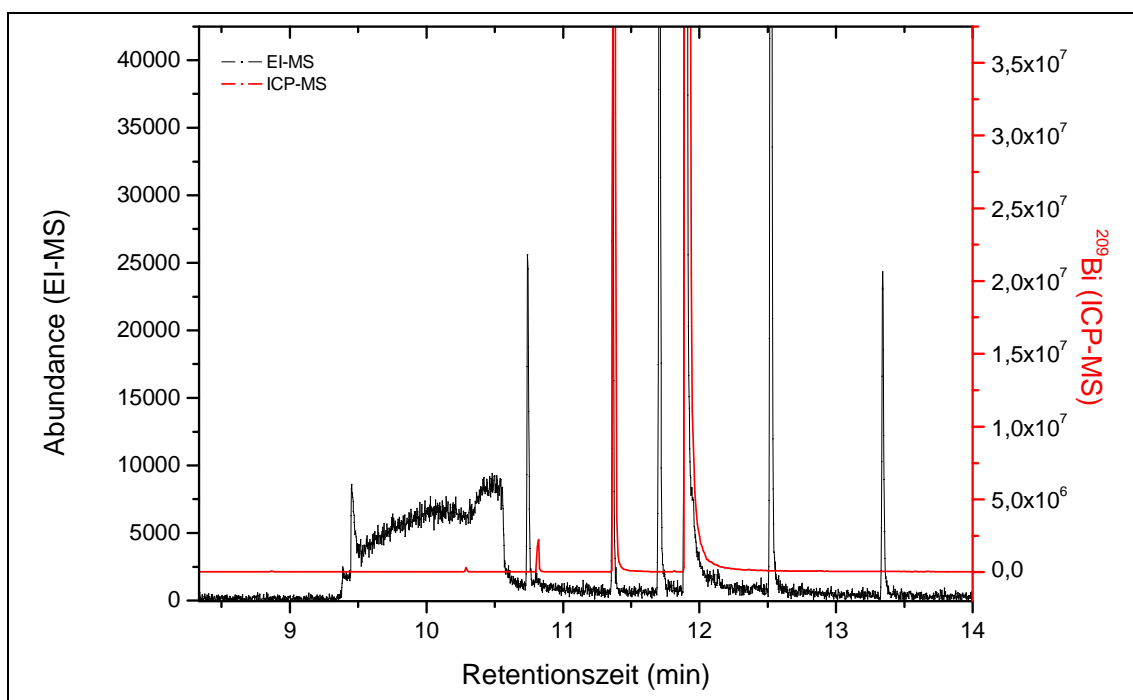


Abbildung 5-34: Simultane Signale des EI-MS (schwarz) und des ICP-MS (rot) nach Ethylierung von HepG2-Zellen, die mit Bismutcystein inkubiert wurden. Die beiden Bismut-Signale des ICP-MS korrelieren mit den Bismut-Spezies, die *via* GC separiert und mit EI-MS identifiziert wurden (HOLLMANN 2008)

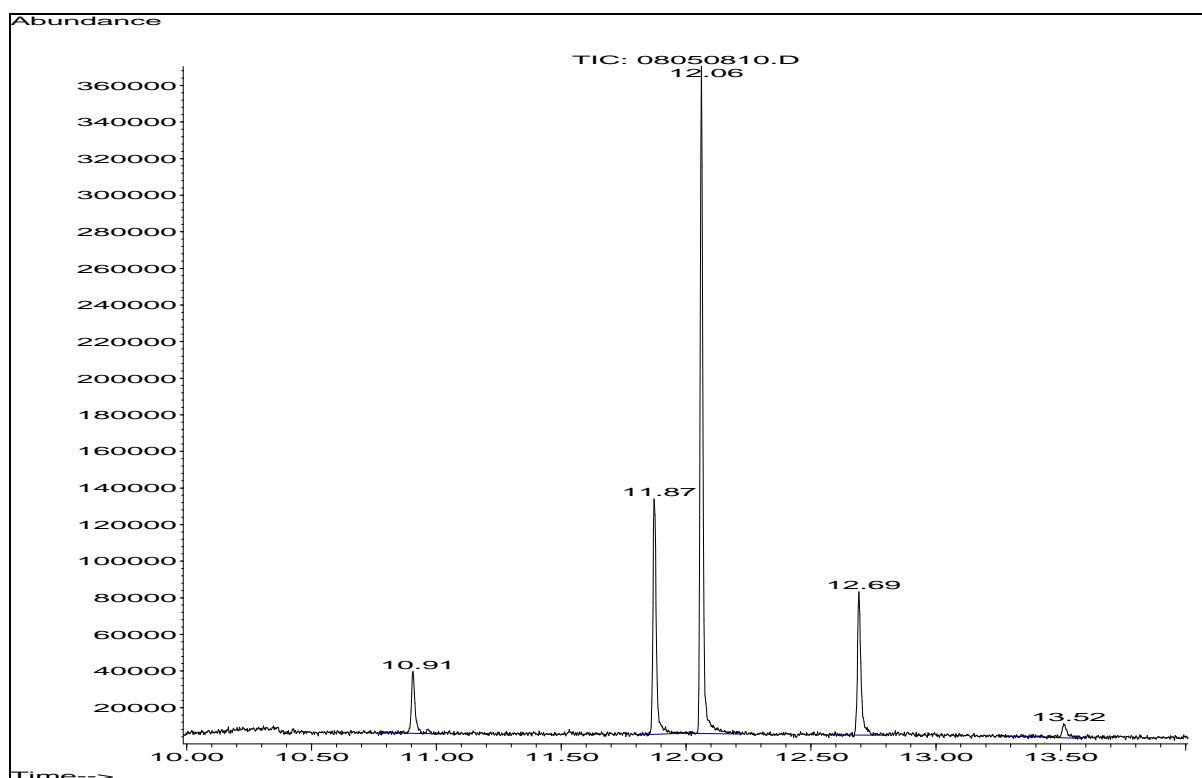


Abbildung 5-35: Chromatogramm der Headspace-Analytik des ethylierten Nährmediums nach 24-stündiger Inkubation mit Bismutglutathion ($t_R = 10,91$ min D3, $t_R = 11,94$ min D4, $t_R = 12,06$ min Triethylbismut, $t_R = 12,69$ min D5, $t_R = 13,52$ min D6).

Weiterhin ist in Abbildung 5-34 die Beziehung des Chromatogramms zum Bismut-Signal des ICP-MS dargestellt. Bei den Signalen nach ca. $t_R = 11,5$ min und $t_R = 12,0$ min, die den Retentionszeiten von Monomethyldiethylbismut und Triethylbismut entsprechen, ist im ICP-MS ein Bismut-Signal detektierbar. In den Leerproben dieser Versuchsreihe konnten keine Bismut-Signale detektiert werden.

In Abbildung 5-35 ist das Chromatogramm der Headspace-Analytik von HepG2-Zellen dargestellt, die mit Bismutglutathion inkubiert wurden und deren Nährlösung 24 Stunden später mit Natriumtetraethylborat derivatisiert wurde.

Die fünf Signale entsprechen den vier cyclischen Siloxanen D3, D4, D5 und D6 sowie Triethylbismut ($t_R = 12,06$ min). Monomethyldiethylbismut wurde in dieser Versuchsreihe nicht detektiert. In den Leerproben wurde keine Bismut-Spezies nachgewiesen.

6 Diskussion

6.1 Analytische Methoden

6.1.1 Gesamtmetallbestimmung in Blut-, Urin und Fäzesproben

In dieser Arbeit wurden alle Gesamtmetallanalysen mittels ICP-MS nach Mikrowellendruckaufschluss mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ durchgeführt. Hierbei befanden sich die Fehler bei der Analytik von Blut- und Urinproben in allen Studiencyclen unterhalb von 3 %. Dieser geringe Fehler wurde vor allem durch die interne Standardisierung der Proben mit 5 ppb Holmium vor der Analytik erreicht, wodurch die erhebliche Tagesdrift in der Empfindlichkeit des ICP-MS kompensiert wurde.

Zudem konnten die Ergebnisse für beide genannten Matrices durch die Messung zertifizierter Referenzmaterialien abgesichert werden, die ca. 10 % der Probenanzahl umfassten.

Bei der Analytik der Fäzesproben wurden in der ersten Probandenstudie Fehler von 5-52 % registriert, die auf die fehlende Homogenität und Repräsentativität der Proben zurückgeführt werden konnte. Aus diesem Grund wurden in der zweiten Studie alle Fäzesproben quantitativ gesammelt und unter Einhaltung der Kühlkette durch eine Kryomühle homogenisiert. Diese Veränderung des analytischen Vorgehens führte im Allgemeinen zu einer durchschnittlichen Standardabweichung von 7 ± 1 % nach einer 5-fach-Bestimmung der Probe. Durch das Fehlen eines zertifizierten Referenzmaterials für Fäzesproben konnten die Bismut-Konzentrationen letztendlich nicht validiert werden.

Im Gegensatz zum hier nicht untersuchten Arsen konnte die ICP-MS-Analytik des Bismuts ohne isobare Interferenzen durchgeführt werden. Wird z. B. die Arsenbestimmung vor allem durch im Plasma gebildetes ArCl^+ gestört, das ebenfalls ein m/z -Verhältnis von 75 besitzt, ist für das Bismut nur die Interferenz des IrO^+ bekannt (MAY UND WIEDMEYER 1998). Da Iridium ein sehr seltenes Platinmetall ist und die Oxidbildungsrate im Plasma bei ca. 0,5 % lag, wurde von einer interferenzfreien Messung ausgegangen. Zur Absicherung wurde aber bei den unter 4.2 (S. 48) durchgeführten Messungen das Iridium bestimmt.

6.1.2 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ via GC/EI-MS/ICP-MS

Der kommerziell erhältliche $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standard wurde zur Absicherung der Reinheit *via* GC/EI-MS/ICP-MS analysiert. Diese von KÖSTERS ET AL. (2005) entwickelte Kopplungstechnik zeichnet sich vor allem durch die Möglichkeit aus, parallel eine Strukturbestimmung (EI-MS) und eine nachweisstarke Elementanalytik (ICP-MS) vorzunehmen, und eignete sich

daher besonders zur Qualitätsüberprüfung des Standards, der frei von Kontaminationen oder teilmethylierten Bismut-Spezies war.

6.1.3 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ via LT-GC/ICP-MS

Die Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ via LT-GC/ICP-MS erfolgte über den Retentionszeitenvergleich mit der vorher identifizierten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standardsubstanz. Diese in der Serienanalytik gängige Praxis ermöglichte bei den hier durchgeführten Analysen sowohl die Identifizierung als auch die Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ über den Gauss-Peak nach $307,1 \pm 5$ s bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 209$. Zur weiteren Absicherung wurde gleichzeitig das ^{13}C -Signal detektiert, um dem Kohlenstoffanteil des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ zu erfassen.

6.1.4 Identifizierung weiterer flüchtiger Bismutspezies

In der Pilotstudie (HIRNER ET AL. 2004) konnten neben $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ auch die flüchtigen Bismutspezies BiH_3 und CH_3BiH_2 detektiert werden. Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit aus mehreren Gründen nicht reproduziert werden:

Die Identifizierung der möglichen flüchtigen Bismutspezies BiH_3 , CH_3BiH_2 und $(\text{CH}_3)_2\text{BiH}$ konnten nicht über den Retentionszeitenvergleich mit Standardsubstanzen abgesichert werden. Nach Syntheseansätzen *in situ* (nach AMBERGER 1961) konnte keiner der o. g. Analyten via GC/MS aufgrund seiner Instabilität im gaschromatographischen System detektiert werden. Auch die Anpassung der Temperaturbedingungen des GC-Ofens, des Injektors und der Transferline waren hierbei nicht erfolgreich.

Zweitens sollte hier keine ausschließliche Identifizierung einer Spezies über eine Siedepunkts-Retentionszeit-Korrelation vorgenommen werden, weil hierbei keine Strukturinformation über den Analyten erhalten wird und dieser Ansatz somit nicht analytisch zweifelsfrei wäre.

Zudem besteht aber auch ein erheblicher Zweifel speziell an der Detektion von BiH_3 in der Pilotstudie. BiH_3 ist sehr instabil und lediglich einer Arbeitsgruppe ist bisher die Reproduktion der BiH_3 -Synthese nach AMBERGER (1961) gelungen (JERZEMBECK ET AL. 2002). Zudem deutet das von D'ULIVO ET AL. (2005) veröffentlichte Massenspektrum nach vorheriger gaschromatographischer Trennung aufgrund seiner geringen Intensität ebenfalls auf eine unzureichende GC-Stabilität des BiH_3 hin und bestätigt somit eigene Vorversuche.

Da die zusätzlichen Bismutsignale nicht durch ein Massenspektrum identifiziert wurden und zudem die Signalintensität unterhalb bzw. nahe der Bestimmungsgrenze lagen, wurde hier von einer Berücksichtigung abgesehen, weil sie letztendlich keinen signifikanten Beitrag zur Massenbilanz geliefert hätten.

6.1.5 Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ *via* LT-GC/ICP-MS und IIK

Die zur Quantifizierung des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ verwendete Interelement-Interaggregats-Kalibrierung ist gelegentlich Gegenstand umfangreicher Fehlerdiskussionen. Die von FELDMANN (1997) etablierte Methode weist nach Angaben des Autors einen Fehler von bis zu 35 % auf.

Neuere Ergebnisse, die auf Parameterstudien des hier verwendeten GC/ICP-MS basieren, lieferten eine Fehlerabschätzung von 5-10 % (DIAZ-BONE 2006).

Eigene Erfahrungen während dieser Arbeit lassen diese beiden Fehlergrenzen als Extremwerte erscheinen. Auf der einen Seite zeigen die geringen Standardabweichungen von Mehrfachmessungen der Atemluftproben in dieser Arbeit, dass diese Methode das Potenzial eines kleineren Fehlers hat, als von FELDMANN beschrieben. Auf der anderen Seite sind die von DIAZ-BONE während einer Parameterstudie ermittelten Einzelfehler in einer routinemäßig durchgeführten Serienanalytik ein wenig höher abzuschätzen, weil hierbei die Schwankungen der Einflussgrößen weniger intensiv beobachtet werden. Hieraus würde demnach ein größerer Fehler als 5-10 % resultieren.

Im Wesentlichen sollte man daher mit einem Fehler unter Berücksichtigung aller Einflussgrößen, die in Gleichung 2-16 (S. 34) beschrieben sind, von 10-20 % rechnen.

6.1.6 Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben *via* GC/MS und LT-GC/ICP-MS

Die Identifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben konnte wie bei den Atemluft- und Blutproben nur durch Retentionszeitenvergleich gegen einen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standard *via* GC/ICP-MS durchgeführt werden. Die erhaltenen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben sollten eigentlich aufgrund ihres bestimmten maximalen Konzentrationsbereiches von 1-6 $\mu\text{g/kg}$ ebenfalls mittels GC/EI-MS detektierbar sein, jedoch besitzt das zur Verfügung stehende Gerät so hohe $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Blindwerte, dass eine zweifelsfreie Identifizierung unter Berücksichtigung des 3 σ -Kriteriums nicht möglich war.

6.1.7 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des ICP-MS und des GC/ICP-MS

Die in Tabelle 6-1 dargestellten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zeigen typische Werte, die während der Probandenstudien erzielt wurden. Anhand der erzielten Nachweisgrenzen kann das ICP-MS und das GC/ICP-MS als universelles Werkzeug zur Speziesanalytik im Ultraspurenbereich angesehen werden.

Tabelle 6-1: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Bismut und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in den untersuchten humanen Matrices

Analyt und Matrix	NWG	BG
Bismut in Blutproben ($\mu\text{g/l}$)	0,03	0,1
Bismut in Urinproben ($\mu\text{g/l}$)	0,001	0,003
Bismut in Fäzesproben ($\mu\text{g/kg}$)	0,44	1,46
$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ als Bismut in Atemluftproben (ng/m^3)	0,1	0,3
$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ als Bismut in Blutproben (pg/ml)	0,01	0,04
$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ als Bismut in Fäzesproben (pg/g)	0,2	0,5

6.1.8 Ethylierung des Zelllysats mit Natriumtetraethylborat

Die hier verwendete Methode zur Ethylierung wurde bereits von FRANKE (2006) validiert und von HOLLMANN (2008) weiter entwickelt. Aus beiden Arbeiten geht hervor, dass das in dieser Arbeit detektierte Monomethyldiethylbismut auch pH-Wert-abhängig als Artefakt auftreten kann. Dies ist aber nicht bei D-PBS und HEPES-Puffer der Fall (HOLLMANN 2008), weshalb die hier detektierte Methylspezies durch die Methylierung des Bismuts durch Hepatozyten entstanden sein muss und kein Artefakt darstellt.

6.2 Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora

Diese Arbeiten repräsentieren die erste *In-vivo*-Studie zur Disposition des Bismuts im Menschen, welche zudem die Analytik von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ beinhaltet, das möglicherweise durch die intestinale Mikroflora gebildet wurde. Neben Daten zur Aufnahme und Eliminierung des Gesamtbismuts, welche im Wesentlichen die Ergebnisse von vorherigen Studien zur Disposition bestätigen (SUN ET AL. 2004; KLOTZ 2000; SLIKKERVEER UND DE WOLFF 1989), werden Daten zur Identifizierung und Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Blut- und Atemluftproben gezeigt.

6.2.1 Disposition und Eliminierung des Gesamtbismuts

Nach der Ingestion von Bismutsubcitrat-haltigen Tabletten stiegen die Bismut-Konzentrationen im Blut in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen sehr schnell bis zu einem inter-individuell variierenden Konzentrationsmaximum von 1,3-158,8 $\mu\text{g/l}$ an. Diese frühen Maxima der Bismut-Konzentrationen weisen auf eine Resorption

bereits im Magen oder den oberen Bereichen des Darms hin. NWOKOLO ET AL. (1992) beobachteten die Persorption (transmucosale Penetration) von Bismut-Partikeln in der gastrischen antralen Mucosa, welche die geringe, aber schnelle Resorption des aufgenommenen Bismuts erklären würde. Obwohl jede Anstrengung unternommen wurde, um die Abläufe der Probenahme und der Analytik zu standardisieren, variierten die Maxima der Gesamtbismut-Konzentration im Blut um mehr als zwei Größenordnungen. Diese Unterschiede in der Bismut-Resorption sind bis dato noch nicht vollständig verstanden, aber es werden verschiedene Faktoren wie die Ernährung und der pH-Wert und somit auch die Löslichkeit des Subcitrats diskutiert (SUN ET AL. 2004). Tierstudien lieferten das Ergebnis, dass die simultane orale Verabreichung von Bismut-Salzen und Thiolen die Bismut-Konzentrationen im Blutplasma ansteigen lässt (CHALEIL ET AL. 1981; WILLIAMS 1977). Ebenso wurden erhöhte Bismut-Konzentrationen im Blut gefunden, nachdem der intragastrische pH-Wert durch die Gabe von Ranitidin oder Omeprazol (TREIBER ET AL. 1994; NWOKOLO ET AL. 1991) anstieg:

Die Löslichkeit von kolloidalem Bismutsubcitrat (CBS) liegt im Bereich von weniger als 1 mg/ml bei $\text{pH} < 7$ bis zu mehreren hundert Milligramm pro Milliliter in reinem Wasser (SUN ET AL. 2004).

Die Eliminierungspfade des Gesamtbismuts waren Atemluft (bis zu 0,03 % als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$), Urin (0,03-1,2 %) und Fäzes. Der überwiegende Teil des Bismuts wurde über den fäkalen Pfad ausgeschieden, wodurch die intestinale Mikroflora dem Metall ausgesetzt war. Interessanterweise ist dies nicht für Arsen der Fall, welches ebenfalls ein Element der Gruppe 15 des Periodensystems ist. Abgesehen von dem weitaus höheren toxischen Potenzial seiner anorganischen Verbindungen wird Arsen überwiegend *via* Urin eliminiert (CRAIG 2003). Als Folge der überwiegenden Eliminierung des Bismuts *via* Fäzes eignet sich dieses Metall ideal zur Untersuchung der intestinalen Biomethylierung.

6.2.2 Identifizierung und Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Das $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in der Atemluft und im Blut wurde zweifelsfrei in Proben aller Studienteilnehmer *via* LT-GC/ICP-MS durch den Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standard identifiziert. Dieser analytische Ansatz wurde durch die Charakterisierung des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Standards *via* GC/EI-MS/ICP-MS (KÖSTERS ET AL. 2005) komplettiert. Diese Strategie ermöglichte das zuverlässige Monitoring von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluft- und Blutproben, welche ein starkes Indiz für das Vorkommen von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in humanen Matrices nach Bismut-Ingestion darstellen. Die Quantifizierung wurde mittels Interelement-Interaggregat-Kalibration (FELDMANN 1997) durchgeführt, welche von DIAZ-BONE (2006) weiter validiert wurde.

6.2.3 Kinetik von $\text{Bi}(\text{CH}_3)_3$

Im Vergleich zur aufgenommenen Bismutmenge wurden nur geringe $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft und dem Blut gemessen. Das Vorkommen von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in der Atemluft zwei Stunden nach der Bismut-Aufnahme deutet auf einen relativ schnellen Methylierungsprozess hin.

Die Verläufe der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in beiden Matrices waren ähnlich, was die nahe Beziehung dieser beiden Matrices in Bezug auf diese flüchtige Bismut-Spezies aufzeigt.

Die beobachteten großen interindividuellen Unterschiede in den AUCs spiegeln das unterschiedliche Potenzial zur Bismut-Methylierung wider. Die Menge des exhaliierten Bismuts wurde mit einem durchschnittlichen Atemzeitvolumen von $0,5 \text{ m}^3/\text{h}$ und der AUC berechnet. Dieser Wert wurde zur Abschätzung der über die Atemluft eliminierten Bismutmenge verwendet.

Bei einigen Studienteilnehmern lagen die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen im Blut unterhalb der Nachweisgrenze, wohingegen die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft messbar waren.

Die Standardabweichungen lagen generell im Bereich von 3 bis 10 %, wobei die höheren Werte auf den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Zerfall während der Probenvorbereitung zurückzuführen sind. Die überwiegende Anzahl der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima wurden im Intervall zwischen 8 und 24 Stunden nach Bismutgabe erreicht. Hierbei konnte eine Unterscheidung in schnellere und langsamere Methylierung beobachtet werden. Da die Anzahl der Probennahmen limitiert war, konnte eine präzise Bestimmung der Konzentrationsmaxima, des Eliminierungsmusters und eine Bestimmung der Halbwertszeit nicht vorgenommen werden.

Die große interindividuell beobachtete Variabilität der Bismut-Methylierung könnte entweder aufgrund von Gen-Polymorphismen, ähnlich wie sie bei der Arsen-Methylierung gefunden wurde (APOSHIAN UND APOSHIAN 2006; DROBNA ET AL. 2004; MARNELL ET AL. 2003), oder durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora, die *ex situ* Bismut methyliert (MICHALKE ET AL. 2008, 2007), erklärt werden.

6.3 Kinetik eines Probanden mit größerer Zeitauflösung nach Ingestion von Bismutsubcitrat

6.3.1 Disposition und Eliminierung des Gesamtbismuts

Die erhaltenen Datensätze für die Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut nach der Ingestion von Bismutsubcitrat-haltigen Tabletten durch einen Probanden und der darauf folgenden längeren Beprobung mit einer größeren Zeitauflösung sind grundsätzlich konsistent mit der unter

6.1 (S. 46) durchgeführten Probandenstudie. Daher gelten hier auch im Wesentlichen die unter 6.2.1 (S. 94) getroffenen allgemeinen Aussagen.

Infolge der Bismutgabe stiegen die Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut auf ein Maximum von 2,2 µg/l (215 mg) bzw. 5,0 µg/l (430 mg) an. Unter Annahme eines ähnlichen Blutvolumens des gleichen Probanden und nur leichten Unterschieden in der körperlichen Verfassung zwischen den Beprobungszeitpunkten entsprechen die erhaltenen Konzentrationen einer Verdopplung der Bismut-Konzentration bei doppelter Bismut-Dosis.

Die Zeitpunkte der Maximalkonzentrationen wurden mit 0,3 h bzw. 0,7 h bestimmt. Eine höhere Bismut-Dosis benötigt folglich länger, bis sie sich im Blut gleichmäßig verteilt hat.

Die unterschiedlichen Halbwertszeiten von 1,3 h (215 mg) und 2,7 h (430 mg) zeigen, dass der Eliminationsprozess nicht der Kinetik 1. Ordnung entspricht. Da Bismut im Blut ans Transferrin, Ferritin, humane Serumalbumin, Metallthionein (II) und Metallthionein (III) bindet (SUN ET AL. 2004), ist daher auch von einer sehr komplexen Eliminationskinetik auszugehen.

Die Bestimmung von Bismut-Konzentrationen im Blut auch nach mehreren Tagen nach der einmaligen Bismutgabe ist als Folge der über mehrere Schritte verlaufenden Elimination zu sehen (NEWTON ET AL. 2001).

Die Eliminierungspfade des Gesamtbismuts waren die Atemluft (0,22-0,46 ppm Bismut als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$), der Urin (0,05-0,1 %) und die Fäzes (91-93 %).

Über den Urin wurden innerhalb der ersten 12 Stunden nach Ingestion 50-53 % des resorbierten Bismuts, unabhängig von der verabreichten Dosis renal eliminiert. Hierbei trat meist mit dem ersten Urin nach der Bismutgabe das absolute Konzentrationsmaximum auf, welches als Folge des ersten exponentiellen Eliminationsschrittes zu sehen ist. Weiterhin wurden lokale Maxima im Morgenurin des Probanden bestimmt, die auf das längere Eliminationsintervall in der Nacht zurückzuführen sind.

In allen Fäzesproben wurden die Maximalkonzentrationen in der zweiten Probe nach Bismutgabe detektiert. Hierbei konnte keine Beziehung zwischen der eingenommenen Bismutmenge und der Bismut-Konzentration in den Fäzes erkannt werden.

Obwohl die Darmpassage bei einer Dosis von 215 mg zweimal ca. 34 Stunden betrug, ist die Erhöhung der Darmpassage auf ca. 55 Stunden als Folge der doppelten Dosis und der daraus resultierenden Konsistenzveränderung des Fäzes als sehr spekulativ anzusehen.

6.3.2 Identifizierung und Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Die Identifizierung und Quantifizierung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in den Atemluft- und Blutproben erfolgte wie bereits unter 6.2.2 (S. 95) beschrieben. Zudem wurden die Fäzesproben sowohl *via*

LT-GC/ICP-MS als auch *via* GC/MS untersucht. Obwohl in allen Proben mit Ausnahme der Vorproben $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ mittels LT-GC/ICP-MS detektiert werden konnte, war eine Detektion mittels GC/MS nicht erfolgreich. Die Ursache hierfür ist die unterschiedliche Nachweisstärke beider Systeme. Die hier gemessenen Maximalkonzentrationen in Fäzesproben liegen im Bereich von 1-6 $\mu\text{g/kg}$ und entsprechen somit dem unteren ppb-Bereich. Während dieser Bereich für die Analytik von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ mittels GC/ICP-MS problemlos zugänglich ist, konnte dieser Bereich für die Analytik *via* GC/MS trotz splitloser Aufgabe des Analyten auf der Seite des Gaschromatographen und der Messung im SIM-Modus auf der Seite des Massenspektrometers nicht erreicht werden.

6.3.3 Kinetik von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Im Vergleich zu den aufgenommenen Bismutmengen wurden nur sehr geringe $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft gemessen. Die entsprechenden Konzentrationen im Blut befanden sich im Wesentlichen unterhalb der Nachweisgrenze oder unter der Bestimmungsgrenze. Lediglich zwei Blutproben hatten eine quantifizierbare Konzentration von 0,04 pg/ml, die zugleich der Bestimmungsgrenze entsprach. Trotzdem ist ein Trend zu erkennen, dass bei höheren $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft die zugehörigen Konzentrationen im Blut oberhalb der Nachweisgrenze liegen, während bei geringeren $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Blut nicht nachweisbar ist.

Der zeitliche Verlauf der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft konnte durch eine höhere Zeitauflösung im Vergleich zu der unter 4.1 (S. 46) dargestellten Probandenstudie wesentlich besser nachvollzogen werden. Durch diese veränderte Probenahmestrategie konnten mehrere $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima über den Studienzeitraum detektiert werden, deren Zeitpunkte mit Ausnahme des jeweils ersten Maximums nach der Nahrungsaufnahme gemessen wurden.

Beim ersten lokalen Maximum nach der Bismutgabe ist eine Korrelation zwischen der Bismut-Konzentration im Blut und der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration in der Atemluft zu erkennen (Abbildung 5-21, S. 80). Der Anstieg der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration erfolgt ca. 9 Stunden nach dem Bismut-Konzentrationsmaximum. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine schnellere Methylierung durch ein z. B. in der Leber lokalisiertes Enzymsystem sein. Die beschriebenen qualitativen Konzentrationsverläufe wurden auch bei anderen Metabolismusstudien für verschiedene Substanzen wie z. B. dem Arsen gefunden, welches im System Leber/Niere methyliert wird (CRAIG 2003).

Das absolute $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaximum in der Atemluft beider eingenommener Bismut-Dosen lag bei $4,0 \text{ ng/m}^3$ und $4,9 \text{ ng/m}^3$ bzw. $9,0 \text{ ng/m}^3$ und entspricht in grober Näherung auch einer Verdoppelung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration bei doppelter Bismut-Dosis.

Die Masse exhaliierten Bismuts, die durch Multiplikation der AUC mit einem durchschnittlichen Atemzeitvolumen von $0,5 \text{ m}^3/\text{h}$ berechnet wurde, zeigte hingegen keine Konzentrationsabhängigkeit. Die exhaliierten Massen bei gleicher Bismut-Dosis unterscheiden sich stark, wohingegen die exhaliierten Bismutmassen bei unterschiedlicher Bismut-Dosis identisch sind. Dies ist möglicherweise auf den Integrationsansatz zurückzuführen, bei dem die Integrationsgrenzen äquidistant zwischen zwei Probenahmezeitpunkte gesetzt wurden. Da die Atemluftproben nicht kontinuierlich über 24 Stunden während des Studienzeitraums gesammelt wurden, könnten hierdurch erhebliche Fehler entstanden sein.

Zudem kann bisher auch nicht gesagt werden, welchen Beitrag die intestinale Biomethylierung zu den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft beiträgt. Durch die Detektion von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in Fäzesproben nach Ingestion von Bismutcitrat-haltigen Tabletten konnte hier zwar der Nachweis erbracht werden, dass mindestens $0,5\text{-}1 \text{ }\mu\text{g}$ Bismut von einem Probanden im Organismus in $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ transformiert werden. Über den Betrag, um den die Masse des transformierten Bismuts tatsächlich größer ist, kann an dieser Stelle lediglich spekuliert werden. Es muss auf jeden Fall angenommen werden, dass während des Studienzeitraums ein Teil, wenn nicht sogar der überwiegende Teil, über die Darmgase eliminiert wird und als Konsequenz durch das hier verwendete analytische Setup nicht erfasst wird.

Als Lösung böte sich hierfür das SHIME-System an, welches ein Modellsystem des Darms in Form eines fünfstufigen, gasdichten Kaskadenreaktors darstellt (MOLLY ET AL.1993).

Weiterhin spielt der Transportvorgang des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Darm eine entscheidende Rolle. Hier bestehen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten: Erstens die Diffusion des flüchtigen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ durch die Darmwand ins Blut, die vom Konzentrationsgradienten, der Austauschfläche und der Dicke der permeablen Darmwand abhängt. Sowohl der Konzentrationsgradient als auch die Austauschfläche und die Dicke der Darmwand werden sicherlich maßgeblich vom Füllstand des Darms beeinflusst. Zweitens könnte das $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ durch die Darmperistaltik in Richtung des Darmausgangs transportiert werden. Hierbei sollte die Gasdurchlässigkeit signifikant vom Füllstand des Darms und der Konsistenz der Fäzes abhängen.

Aus diesen Gründen war kein Zusammenhang zwischen den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in den Fäzesproben und den Atemluftproben erkennbar.

6.4 Massenbilanzen der Bismutstudien

Die berechneten Massenbilanzen der einzelnen Studien sind in Tabelle 6-2 dargestellt. Bei allen hier durchgeführten Studien ist die Größenordnung der *via* Atemluft und Urin eliminierten Bismutmenge in einer ähnlichen Größenordnung. Die um den Faktor 2-5 höhere über die Atemluft eliminierte Bismutmenge der unter 4.1 durchgeführten Studie wird mit dem Fehler des Integrationsansatzes erklärt. Als Folge des großen Zeitabstandes zwischen zwei Probenahmen verfälschen vor allem hohe Konzentrationen die eliminierte Bismutmenge zu höheren Werten.

Die Berechnung des fäkal eliminierten Bismuts erfolgte bei den unter 4.1. und 4.2 durchgeführten Studien nach zwei Ansätzen. Während unter 4.1 aufgrund der lückenhaften Datenlage die fäkal eliminierte Menge über die Differenz aus eingenommener Bismutmenge und anderen Eliminationspfaden unter Vernachlässigung der Disposition in menschlichen Körper berechnet wurde, erfolgte die Berechnung unter 4.2 durch die Multiplikation der Bismut-Konzentrationen der homogenisierten Fäzesproben mit den entsprechenden Fäzesmassen.

Tabelle 6-2: Massenbilanzen der einzelnen Bismutstudien

Studie	Verabreichte Bismutmasse	Eliminationspfade			Summe	Differenz
		Atemluft	Urin	Fäzes		
4.1	215 mg	1,0 ppm	0,09 %	> 99 %	100 %	0 %
4.2	215 mg	0,5 ppm	0,05 %	92 %	92,05 %	≈ 7,95 %
4.2	215 mg	0,3 ppm	0,02 %	93 %	93,02 %	≈ 6,98 %
4.2	430 mg	0,2 ppm	0,10 %	91 %	91,10 %	≈ 8,90 %

Als Konsequenz des Berechnungsansatzes konnte bei der Studie 4.1 keine Differenz aus eingenommener und eliminierten Bismutmenge in der Massenbilanz berechnet werden, die aber durch das modifizierte Studiendesign erfasst wurde. Demnach verbleiben ca. 7-9 % des eingenommenen Bismuts im Studienzeitraum im humanen Organismus. Ein nicht quantifizierbarer Anteil hiervon wurde durch die Resorption im Organismus verteilt und wird späterhin eliminiert, was anhand der Bismut-Konzentrationen im Blut von 0,3-0,5 µg/l am Ende des Studienzeitraums belegt wird. Zudem ist anzunehmen, dass der Gastrointestinaltrakt keine Kaskade von idealen Reaktoren darstellt und somit ein weiterer nicht quantifizierbarer Anteil in Totzonen verbleibt und erst über einen längeren Zeitraum eliminiert wird.

6.5 Auswirkungen des veränderten Studiendesigns auf die Bestimmung von Bismut- und $\text{Bi}(\text{CH}_3)_3$ -Konzentrationen in humanen Matrices

Das Studiendesign der unter 4.1 (S. 46) durchgeführte Studie war hinsichtlich der Probenahmezeitpunkte so konzipiert, dass im gesamten Studienzeitraum mindestens einmal pro Tag jede Matrix beprobt werden sollte. Hierbei wurden dort festgelegten Probenahmezeitpunkte aus Erfahrungswerten zahlreicher anderer intern und extern durchgeführter Studien gewählt. Nach der Analytik der im Studienzeitraum gesammelten Proben zeigte das angewendete Probenahmeschema jedoch einige Schwächen auf. So konnten die Bismut-Konzentrationsmaxima im Blut- und Fäzesproben sowie die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima in Atemluft-, Blut- und Fäzesproben nicht mit einer zufrieden stellenden Präzision hinsichtlich des Zeitpunktes bestimmt werden, weil die Probenahmezeitpunkte je nach Matrix zu weit auseinander lagen. Weiterhin war eine Quantifizierung der Bismut- und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben sowohl wegen der zu geringen Probenmenge als auch wegen der fehlenden Repräsentativität nicht möglich. Zusätzlich konnte keine sinnvolle Massenbilanz durchgeführt werden, weil die Urinvolumina und Fäzesmassen unzureichend durch die Probanden dokumentiert wurden. Hierdurch war lediglich eine Abschätzung des fäkal eliminierten Bismuts unter der Vernachlässigung der Disposition im humanen Organismus möglich, indem die exhalierten und renal eliminierten Bismutmassen von der eingenommenen Bismutdosis subtrahiert wurden.

Durch die Änderung des Studiendesigns konnten nicht nur die o. g. Schwächen fast vollständig behoben werden, sondern weiterhin weitere wichtige Informationen zum Bismut-Metabolismus im menschlichen Körper gewonnen werden.

Durch die Verringerung des Probenahmeabstandes bei Blutproben auf 10 Minuten innerhalb der ersten Stunden nach Bismutgabe konnte das Bismut-Konzentrationsmaximum dosisabhängig zu 0,2 h (215 mg) bzw. 0,7 h (430 mg) bestimmt werden.

Weiterhin war aufgrund der quantitativen Sammlung und anschließenden Homogenisierung der Fäzesproben, eine Bestimmung der Bismut- und der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen, der Maximalkonzentrationen und auch die Einbindung in die Massenbilanz möglich.

Einen negativen Einfluss durch die Änderung des Studiendesigns wurde bei der Bestimmung der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen im Blut festgestellt. Da lediglich ein Proband für diese umfangreiche Untersuchung zur Verfügung stand und dieser zudem wenig $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Körper produzierte, konnten hier kein besonders aussagekräftiger Datensatz erhalten werden, weil die NWG oder die Bestimmungsgrenze nicht überschritten wurde. Dieser geringe Erkenntnisgewinn konnte aber durch die Ergebnisse der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsbestimmungen in der

Atemluft mit einer erheblich höheren Zeitaufösung relativiert werden. Die Detektion mehrerer $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationsmaxima nach der Bismutgabe, die fortwährend nach der Nahrungsaufnahme des Probanden auftraten, deuten auf einen in der Form noch nicht beobachteten Metabolisierungsprozess des Bismuts hin, bei dem die beteiligten Enzyme oder Enzymsysteme durch die Nahrungsaufnahme aktiviert werden, wenngleich die erhoffte Eingrenzung des Methylierungsortes auf die das System Leber/Niere oder den Darm durch die Änderung des Studiendesigns nicht erzielt werden konnte, weil der beschriebene Effekt sowohl Enzymsysteme in der Leber als auch im Darm aktivieren würde.

6.6 Untersuchungen humaner Hepatozyten zur Bismut-Methylierung

Bei der Analytik des Headspaces nach Inkubation humaner Hepatozyten (HepG2) mit Bismutsubcitrat, Bismutcystein oder Bismutglutathion *in vitro* konnte in keinem Fall $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ detektiert werden. Entweder lag die zu detektierende $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze mit der Folge, dass die Menge gebildeten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ viel zu gering für die Analytik *via* LT-GC/ICP-MS war, oder aber die Leber ist nicht zur Bildung der permethylierten Bismut-Spezies im untersuchten Zeitfenster von 24 Stunden bzw. im Allgemeinen befähigt.

Grundsätzlich ist durch die Arbeit von VON RECKLINGHAUSEN *et al.* (2008) bekannt, dass Bismut von humanen Hepatozyten aufgenommen wird. Weiterhin besitzt die Leber ein großes Methylierungspotenzial (MÜHLENFELD 1999), weshalb in einem weiteren Versuch die Ethylierung des Zelllysats von HepG2-Zellkulturen durchgeführt wurde (HOLLMANN 2008). Hierbei wurde erstmals festgestellt, dass humane Hepatozyten Bismut *in vitro* methylieren, jedoch konnte nach 24 Stunden lediglich die Monomethylspezies nach Inkubation mit CBS bzw. Bismutcystein und nachfolgender Ethylierung *via* GC/EI-MS/ICP-MS nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spräche vor allem für die oben getroffene Annahme, dass humane Hepatozyten im beobachteten Zeitfenster nicht in der Lage sind, die permethylierte Spezies zu generieren, zumal die Bildung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ mit einer Standardbildungsenthalpie von $\Delta H_f^\circ = 194 \text{ kJ/mol}$ (ELSCHENBROICH 2005) energetisch nicht begünstigt ist.

Zudem könnte angenommen werden, dass $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ und anorganisches Bismut über Ligandenaustauschreaktionen aus der Monomethylspezies gebildet werden (JERZEMBECK ET AL. 2002) oder aber durch Disproportionierung entstehen (AMBERGER 1961). Da dieser Prozess nicht quantitativ verläuft, würde es zu einer weitaus geringeren $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentration führen, die im Headspace nicht detektierbar wäre.

Inwieweit die Leber insgesamt aber zur Bildung von $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ befähigt oder eben nicht befähigt ist, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Möglicherweise ist die Anzahl von 10^6 Hepatozyten zu gering, so dass die permethylierte Spezies nicht im Gasraum der Zellkultur nachgewiesen werden kann.

Wie oben bereits erwähnt, wurde bei den Versuchen mit humanen Hepatozyten *in vitro* gezeigt, dass CBS und Bismutcystein von humanen Hepatozyten monomethyliert werden, wohingegen aus dem Bismutglutathion keine Monomethylbismut-Spezies gebildet wird.

Diese Beobachtung zeigt Ähnlichkeiten mit dem Mechanismus für den Transport von Methylquecksilber in den Intrazellulärraum, den CLARKSON ET AL. (2007) beschrieben haben. Demnach könnte Bismutcystein über Aminosäuretransporter in den Intrazellulärraum gelangen, in der Zelle methyliert, und anschließend wieder ausgeschleust werden. Die Methylierung von CBS wäre über diesen Mechanismus auch erklärbar, da im Zellkulturmedium u. a. die Aminosäure L-Glutamin sowie nicht-essentielle Aminosäuren vorhanden sind, die nach der Komplexbildung dem Bismut den Eintritt in die Zelle ermöglichen würde.

Die Tatsache, dass die Methylierung von Bismutglutathion nicht gezeigt wurde, geht mit der Beobachtung einher, dass Bismutglutathion wesentlich weniger von der Zelle aufgenommen wird (VON RECKLINGHAUSEN ET AL. 2008).

6.7 Ursprung des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$

Zwei Szenarien sind für die Bismut-Methylierung im menschlichen Körper plausibel:

Ein endogener Pfad, wie er für Arsen und andere Elemente beschrieben wurde (APOSHIAN UND APOSHIAN 2006; THAYER 2002), und ein mikrobieller Pfad unter Beteiligung der Mikroorganismen des Darms. Auf der Grundlage der hier erhaltenen Datensätze ist eine Bestimmung des Ursprungsortes nicht möglich.

Einige Indizien deuten auf die Bismut-Methylierung im Darm: Erstens wurde durch die anaerobe Inkubation von Fäzesproben von Probanden, die Bismut eingenommen hatten, gezeigt, dass Mikroorganismen befähigt sind, *ex situ* Bismut zu methylieren (HIRNER ET AL. 2004; MICHALKE ET AL. 2008). Weiterhin konnten Mikroorganismenstämme, im speziellen Methanogene, isoliert werden, die in Reinkulturen Bismut methylieren konnten (MICHALKE ET AL. 2007). Zuletzt wurde in dieser Arbeit der Nachweis von signifikanten Mengen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ in frischen Fäzesproben gezeigt, der einen starken Hinweis auf die Beteiligung der intestinalen Mikroflora bei der Biomethylierung von Bismut *in vivo* darstellt. Diese Daten in Kombination mit der Tatsache, dass Bismut überwiegend *via* Fäzes ausgeschieden wird, untermauern die Annahme, dass die Bismut-Methylierung im Darm stattfindet. Nach der mikrobiellen

Volatilisierung des $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Darm, diffundiert diese Spezies ins Blut, durch das es nachfolgend zu den Lungen transportiert und ausgeatmet wird.

Zudem kann bei der jetzigen Datenlage ein endogen enzymatischer Pfad unter Beteiligung der Leber nicht ausgeschlossen werden. Eine abiotische Bismut-Methylierung wurde mittels Methyl-Cobalamin durchgeführt (MICHALKE ET AL. 2002). Obwohl die nicht-enzymatische Methylierung langsamer als die durch Mikroorganismen enzymatisch katalysierte Methylierung ist, leisten humane Leberzellen, wie hier gezeigt, einen Beitrag zur Bismut-Methylierung. Weiterhin ist es möglich, dass nicht identifizierte Enzyme ebenfalls zur Bismut-Methylierung befähigt sind.

Ein möglicher Hinweis auf die Beteiligung der Leber bei der Bismut-Methylierung ist die Detektion von geringen Mengen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ bereits zwei Stunden nach der Bismutgabe. Normalerweise dauert der Transport der Nahrung in den Darm länger als zwei Stunden, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass die intestinalen Mikroorganismen in diesem Zeitraum für die $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Produktion verantwortlich sind. Auch diese These konnte durch das hier durchgeführte Langzeituntersuchung eines Probanden und die Korrelation der Gesamtbismut-Konzentrationen im Blut mit den $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft erhärtet werden. Während der Anstieg der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen nach 8 oder 24 Stunden auf eine Dominanz der intestinalen Methylierung hinweisen, wurden ähnliche Zeitprofile für die methylierten Arsenspezies gefunden, welche vorwiegend in der Leber gebildet werden (YU 1999; STYBLO ET AL. 1999). Weitere Studien werden daher notwendig sein, um die relativen Beiträge der Leber und der intestinalen Mikroflora zur Bismut-Methylierung zu differenzieren.

6.8 Toxikologische Folgen der Bismut-Volatilisierung

Nach der Einnahme eines Bismutcitrat-haltigen Medikamentes wurden lediglich geringe $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in der Atemluft und im Blut detektiert. Wenngleich der Ort der $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Bildung noch detailliert untersucht werden muss, sollte die Bildung einer Bismut-Spezies mit höherer Toxizität in diesem metabolischen Schritt herausgestellt werden. Basierend auf den verfügbaren LD_{50} -Werten für CBS (7047 mg/kg, Maus, oral, (ZHANG ET AL. 2006)) und $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (484 mg/kg, Hase, oral) steigt die akute Toxizität um mehr als eine Größenordnung. Es sollte zudem beachtet werden, dass die Lipophilie des anorganischen Bismuts durch die Methylierung ansteigt, was den Transfer durch biologische Membranen wie der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Weiterhin kann spekuliert werden, ob die in den 1970er Jahren bei französischen und australischen Patienten diagnostizierten Enzephalopathien mit der

Bildung des flüchtigen und toxischen $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ verknüpft sind (MICHALKE ET AL. 2002). Diese Patienten nahmen über längere Zeiträume Bismut-Salze zur Behandlung von Zwölffingerdarmgeschwüren ein (LOWE 1974; MARTIN-BOUYER 1978). Die in der Literatur beschriebene Größenordnung von bis zu 20 g eingenommenen Bismut-Salz pro Tag über einen Zeitraum von 20 Tagen pro Monat lässt auf jeden Fall die Vermutung zu, dass die gebildeten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Mengen wesentlich größer waren und somit ein weitaus höheres toxisches Potenzial vorhanden war.

7 Zusammenfassung

Die Biomethylierung und die Hydridbildung von Metall(oid)en sind ubiquitäre Prozesse in der Umwelt, die zur Bildung von chemischen Spezies mit erhöhter Mobilität und Toxizität führen können. Während viel über die Wechselwirkung von Metall(oid)en mit Mikroorganismen unter Umweltbedingungen ermittelt wurde, sind bisher nur wenige Informationen über vergleichbare Prozesse im Menschen vorhanden.

Diese Arbeit stellt einen Beitrag zur Biotransformation und Eliminierung von Bismut im Menschen dar, die in zwei Probandenstudien mit massenspektrometrischen Kopplungstechniken (GC/ICP-MS, GC/EI-MS/ICP-MS, GC/MS und ICP-MS) untersucht wurden. Weiterhin wurden humane Hepatozyten (HepG2) mit Bismut-haltigen Reagenzien (CBS, Bismutcystein und Bismutglutathion) inkubiert, um durch die Detektion der Metaboliten *in vitro* Hinweise auf die Beteiligung der humanen Leber an der Biomethylierung des Bismuts zu erhalten.

Bei der ersten Probandenstudie wurde 20 männlichen Probanden eine Dosis von 215 mg Bismut in Form von Bismutsubcitrat oral verabreicht und die Biotransformation und Eliminierung des Bismut beobachtet. Die sehr geringe Bismut-Resorption im Magen und im oberen Darmsegment wurde über die geringe renal eliminierte Bismutmenge nachgewiesen. Nach der Bismutgabe stiegen die Bismut-Konzentrationen im Blut sehr schnell innerhalb der ersten Stunde bis zu einem Maximum an. Der überwiegende Teil des Bismuts wurde fäkal eliminiert. Zudem wurden Spuren des Metaboliten Trimethylbismut ((CH₃)₃Bi) *via* LT-GC/ICP-MS in Blut- und Atemproben detektiert. Bis zu 2,50 pg/ml (Blut) und 458 ng/m³ (Atemluft) wurden mit großer interindividueller Variation bestimmt. Die Eliminationspfade waren die Atemluft (bis zu 0,03 ‰), der Urin (0,03-1,2 %) und die Fäzes.

In einer weiteren Probandenstudie wurde die Biotransformation und Eliminierung des Bismuts mit einer größeren Zeitauflösung beobachtet. Hierzu wurde in drei Teilstudien dem jeweils gleichen männlichen Probanden zweimal je 215 mg und einmal 430 mg Bismut in Form von Bismutsubcitrat verabreicht. Neben der grundsätzlichen Bestätigung der Ergebnisse aus der ersten Studie wurden durch das modifizierte Studiendesign mehrere charakteristische (CH₃)₃Bi-Konzentrationsmaxima in der Atemluft detektiert, welche stets nach der Nahrungsaufnahme beobachtet wurden. Diese Beobachtung deutet auf die Beteiligung von Enzymen bei der Methylierung des Bismuts hin, die durch die Nahrungsaufnahme aktiviert werden. Weiterhin wurde (CH₃)₃Bi in Fäzesproben nachgewiesen und (CH₃)₃Bi-Maximalkonzentrationen von 1738 ng/kg bis 5679 ng/kg bestimmt.

Bei den *In-vitro*-Experimenten mit HepG2-Zellkulturen wurde nach der 24-stündigen Inkubation mit Bismut-haltigen Reagenzien kein $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ im Headspace der Zellkultur nachgewiesen. Nach der Ethylierung des Zelllysats mit Natriumtetraethylborat bei pH 7 wurde Monomethyldiethylbismut nur in den Zellkulturen nachgewiesen, die mit Bismutsubcitrat und Bismutcystein inkubiert wurden; der gleiche Versuch mit Bismutglutathion war negativ. Diese Ergebnisse zeigen, dass humane Leberzellen das Potenzial zur Bismutmethylierung haben und dass die permethylierte Spezies nicht im Beobachtungszeitraum gebildet wird. Die Methylierung des Bismutglutathions wurde möglicherweise aufgrund der geringen Aufnahme des Bismutglutathions durch die humanen Leberzellen nicht nachgewiesen.

Letztendlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Bismut im humanen Organismus methyliert wird. Durch die hier präsentierten Ergebnisse erscheint es so, dass die intestinale Mikroflora und die humane Leber an dieser Biotransformation beteiligt sind.

8 Summary

Biological methylation and hydride formation of metals and metalloids are ubiquitous environmental processes that can lead to the formation of chemical species with significantly increased mobility and toxicity. While much is known about the interaction of metal(loid)s with microorganisms in environmental settings, little information has been gathered on respective processes inside the human body as yet.

Here, the biotransformation and excretion of bismuth following ingestion of bismuth in two studies were investigated with hyphenated mass spectrometric techniques (GC/ICP-MS, GC/EI-MS/ICP-MS, GC/MS and ICP-MS). In addition, human hepatoma cells (HepG2) were incubated with bismuth containing compounds (CBS, bismuth cysteine, bismuth glutathione) in order to investigate the involvement of the human liver in the biomethylation of bismuth *in vitro*.

In the first study the biotransformation and excretion of bismuth following ingestion of bismuth subcitrate (215 mg bismuth) to 20 male human volunteers were investigated. Bismuth absorption in the stomach and upper intestine was very low, as evidenced by the small quantity of bismuth eliminated *via* the renal route. Total bismuth concentrations in blood increased rapidly in the first hour following ingestion. Most of the ingested bismuth was excreted *via* feces during the study period. Trace levels of the metabolite trimethylbismuth ((CH₃)₃Bi) were detected *via* low temperature-gas chromatography/inductively coupled plasma-mass spectrometry (LT-GC/ICP-MS) in blood samples and in exhaled air samples. Concentrations were in the range of up to 2.50 pg/ml (blood) and 0.8-458 ng/m³ (exhaled air), with high inter-individual variation. Elimination routes of bismuth were exhaled air (up to 0.03 ‰), urine (0.03-1.2 ‰), and feces.

In the second study the biotransformation and excretion were observed with a higher time resolution. Here, in three experiments 215 mg bismuth (twice) and 430 mg bismuth (single) were given to the same male volunteer. The results of the first study were basically confirmed and, moreover, a few characteristic (CH₃)₃Bi concentration maxima were detected in exhaled air – each time after food intake. This observation indicates the involvement of enzymes in the biotransformation of bismuth, which were activated by food intake. In addition to this result (CH₃)₃Bi was detected in feces samples in a range from 1738 ng/kg to 5679 ng/kg.

The headspace analysis of human hepatoma cells (HepG2) which were incubated with bismuth containing compounds (CBS, bismuth cysteine, bismuth glutathione) indicated that (CH₃)₃Bi was not detectable in any of the samples. After ethylation with sodium

tetraethylborate at pH 7 monomethyl diethyl bismuth was found in cell lysates of cell cultures which were incubated with CBS or bismuth cysteine. In contrast, no monomethyl diethyl bismuth was not detectable after incubation with bismuth glutathione.

These results show that human hepatoma cells have the potential to methylate bismuth and that the permethylated species is not generated within the observed time period. If methylation was not observed as in the case of bismuth glutathione, this might result from the low uptake of this compound into the hepatoma cells.

In conclusion, it was shown in these studies that bismuth is methylated in the human body. It appears from the results that both the intestinal microflora and the liver are involved in this biotransformation.

9 Ausblick

Im Hinblick auf die anhaltende Verwendung von Bismut-Verbindungen als Medikament und aufgrund des häufigen Kontakts von Menschen mit Bismut-haltigen Kosmetika sind weitere Studien zum humanen Bismut-Metabolismus notwendig. In diesen Studien sollte eine den Einfluss der Nahrung sowohl auf die Resorption als auch die Methylierung des Bismuts und die Beteiligung der intestinalen Mikroflora bei der metabolischen Aktivität einer als Medikament verwendeten Metallverbindung aufgeklärt werden. Zudem sollte eine weitere Identifikation der an der Methylierung beteiligten Mikroorganismen vorgenommen werden. Alternative Methylierungspfade, falls vorhanden, sollten ebenso detailliert untersucht werden, z. B. durch die Charakterisierung der methylierenden Enzymsysteme in der Leber nach Inkubation mit Bismut-haltigen Verbindungen.

Weiterhin besteht die Notwendigkeit einer detaillierten Bismut-Aminosäure- und Bismut-Protein-Forschung, die sowohl die Wechselwirkung von Proteinen und Aminosäuren mit Bismut und Bismutspezies als auch die Transportpfade der gebildeten Addukte im humanen Organismus untersucht.

Die Durchführung von gezielten Studien zur Feststellung von Parallelen und Unterschieden mit anderen Schwermetallen *in vivo* und *in vitro* würde die immernoch vorhandenen Lücken im Verständnis des humanen Metallmetabolismus verringern.

10 Literatur

Amberger E (1961) Hydride des Wismuts. *Chem Ber* **94**:1447-1452

Amouroux D, Tessier E, Pecheyran C, Donard OFX (1998) Sampling and probing volatile metal(oid) species in natural waters by in-situ purge and cryogenic trapping followed by gas-chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (P-CT-GC-ICP/MS). *Anal Chim Acta* **377**:241-254

Aposhian HV, Aposhian MM (2006) Arsenic toxicology: five questions. *Chem Res Toxicol* **19**:1-15

Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Sampayo-Reyes A, Wollenberg ML (2004) A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**:327-335

Aposhian HV, Zakharyan RA, Avram MD, Kopplin MJ, Wollenberg ML (2003) Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* **193**:1-8

Asato E, Katsura K, Mikuriya M, Turpeinen U, Mutikainen I, Reedijk J (1995) Synthesis, structure, and spectroscopic properties of bismuth citrate compounds and the bismuth-containing ulcer-healing agent colloidal bismuth subcitrate (CBS). 4. Crystal-structure and solution behavior of a unique dodecanuclear cluster $(\text{NH}_4)_{12}[\text{Bi}_{12}\text{O}_8(\text{cit})_8](\text{H}_2\text{O})_{10}$. *Inorg Chem* **34**:2447-2454

Baldi F (1997) Microbial transformation of mercury species and their importance in the biogeochemical cycle of mercury. *Met Ions Biol Syst* **34**:213-257

Bandarin V, Matthews RG (2001) Quantitation of rate enhancements attained by the binding of cobalamin to methionine synthase. *Biochemistry* **40**:5056-5064

Banerjee R (1999) Chemistry and biochemistry of B_{12} . Wiley, New York.

Baxter GF (1992) Settling the stomach. *Chem Brit* **28**:445-448

Benet LZ (1991) Safety and pharmacokinetics: colloidal bismuth subcitrate. *Scand J Gastroenterol Suppl* **185**:29-35

Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP (2001) The influence of sulfide on solid phase mercury bioavailability for methylation by pure cultures of *Desulfobulbus propionicus* (1pr3). *Environ Sci Technol* **35**:127-132

Benoit JM, Mason RP, Gilmour CC (1999) Estimation of mercury-sulfide speciation in sediment pore waters using octanol-water partitioning and implications for availability to methylating bacteria. *Environ Toxicol Chem* **18**:2138-2141

Benoit JM, Gilmour CC, Mason RP, Heyes A (1999) Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environ Sci Technol* **33**:951-957

Briand GG, Burford N, Eelman MD, Aumeerally N, Chen L, Cameron TS, Robertson KN (2004) Identification, isolation, and characterization of cysteinate and thiolactate complexes of bismuth. *Inorg Chem* **43**:6495-6500

Briand GG, Burford N (1999) Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. *Chem Rev* **99**:2601-2657

Buge A, Rancurel G, Poisson M, Dechy H (1974) Myoclonic encephalopathies induced by bismuth salts. 6 cases observed during long-term oral treatment. *Nouv Presse Med* **3**:2315-2320

Buge A, Rancurel G, Poisson M, Gazengel J, Dechy H, Fressinaud L, Emile J (1974) 20 cases of acute encephalopathy with myoclonus during treatments with orally-administered bismuth salts. *Ann Med Interne (Paris)* **125**:877-888

Burford N, Eelman MD (2005) Bismuth based pharmaceuticals. In: Geilen M, Tiekink ER (Eds) *Metallotherapeutic drugs & metal based diagnostic agents*. Wiley, New York:529-540

Burford N, Eelman MD, Mahony DE, Morash M (2003) Definitive identification of cysteine and glutathione complexes of bismuth by mass spectrometry: assessing the biochemical fate of bismuth pharmaceutical agents. *Chem Commun* **9**:146-147

Burke JM, Jurcic JG (2002) Antibody therapy in acute myeloid leukemia: current status and future directions. *Clin Lymphoma* **2 Suppl 1**:S12-S18

Burns RJ, Thomas DW, Barron VJ (1974) Reversible Encephalopathy Possibly Associated with Bismuth Subgallate Ingestion. *Aust Nz J Med* **4**:109-110

Cammann K (2001) Instrumentelle Analytische Chemie. Spektrum, Heidelberg

Canena J, Reis J, Pinto AS, Santos AM, Leitao J, Pinheiro T, Quina MG (1998) Distribution of bismuth in the rat after oral dosing with ranitidine bismuth citrate and bismuth subcitrate. *J Pharm Pharmacol* **50**:279-283

Celo V, Lean DRS, Scott SL (2006) Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **368**:126-137

Ceulemans M, Adams FC (1996) Integrated sample preparation and speciation analysis for the simultaneous determination of methylated species of tin, lead and mercury in water by purge-and-trap injection-capillary gas chromatography atomic emission spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* **11**:201-206

Chaleil D, Lefevre F, Allain P, Martin GJ (1981) Enhanced bismuth digestive absorption in rats by some sulfhydryl compounds - NMR-study of complexes formed. *J Inorg Biochem* **15**:213-221

Challenger F (1945) Biological methylation. *Chem Rev* **36**:315-361

Chasteen TG, Wiggli M, Bentley R (2002) Of garlic, mice and Gmelin: the odor of trimethylarsine. *Appl Organometal Chem* **16**:281-286

Cheng X, Blumenthal RM (1999) S-Adenosylmethionine-dependent methyltransferases: structure and functions. World Scientific, Singapore

Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N (2007) Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med* **50**:757-764.

Clarkson TW (1993) Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu Rev Pharmacol* **33**:545-571

Clarkson TW, Amin-Zaki L, Al-Tikriti SJ (1976) An outbreak of methylmercury poisoning due to the consumption of contaminated grain. *Fed Proc* **35**:2395-2399

Craig PJ (Ed) (2003) Organometallic compounds in the environment. 2nd edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester

Cullen WR, Reimer KJ (1989) Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev* **89**:713-764

D'Ulivo A, Mester Z, Sturgeon RE (2005) The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents. *Spectrochim Acta B* **60**:423-438

De Marcillac P, Coron N, Dambier G, Leblanc J, Moalic JP (2003) Experimental detection of alpha-particles from the radioactive decay of natural bismuth. *Nature* **422**:876-878

Diaz-Bone RA (2006) Untersuchung metall(oid)organischer Verbindungen nach biologischer Abfallbehandlung mittels einer neu entwickelten GC-ICP-MS-Methode. *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, Essen

Dopp E (2008), unveröffentlichtes Foto einer HepG2-Zellkultur, Universitätsklinikum Essen, Essen.

Dopp E, Hartmann LM, Florea AM, Rettenmeier AW, Hirner AV (2004) Environmental distribution, analysis and toxicity of organometal(loid) compounds. *Crit Rev Toxicol* **34**:1-33.

Doukov T, Seravalli J, Stezowski JJ, Ragsdale SV (2000) Crystal structure of a methyltetrahydrofolate- and corrinoid-dependent methyltransferase. *Structure* **8**:817-830

Dresow B, Nielsen P, Fischer R, Wendel J, Gabbe EE, Heinrich HC (1991) Bioavailability of bismuth from ²⁰⁵Bi-labelled pharmaceutical oral Bi-preparations in rats. *Arch Toxicol* **65**:646-650

Drobna Z, Waters SB, Walton FS, LeCluyse EL, Thomas DJ, Styblo M (2004) Interindividual variation in the metabolism of arsenic in cultured primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **201**:166-177

Ebdon L, Pitts L, Cornelis R, Crews H, Donard OFX, Quevauviller Ph (Eds) (2001) Trace elements speciation for environment, food and health. Royal Society of Chemistry, London

Elschenbroich C (2005) Organometallchemie. Teubner, Wiesbaden

Enghag P (2004) Arsenic, antimony and bismuth. In: Enghag P (Ed) Encyclopedia of the elements. Wiley-VCH, Weinheim:1001-1026

Errecalde O, Maury G, Pinel R (1995) Biomethylation phenomena involving metals in the environment. *Actual Chimique*:35-39

- Escourolle R, Bourdon R, Galli A, Galle P, Jaudon MC, Hauw JJ, Gray F (1977) Neuropathologic and toxicologic study of 12 cases of bismuth encephalopathy. *Rev Neurol (Paris)* **133**:153-163
- Fatoki OS (1997) Biomethylation in the natural environment: a review. *S Afr J Sci* **93**:366-370
- Feldmann J, Haas K, Naels L, Wehmeier S (2001) Investigations into biovolatilization of metal(oid)s in the environment by using GC-ICP-TOF-MS. In: Holland G, Tanner SD (Eds) Plasma Source Mass Spectrometry. Royal Society of Chemistry, Cambridge:361
- Feldmann J, Krupp EM, Glindemann D, Hirner AV, Cullen WR (1999) Methylated bismuth in the environment. *Appl Organometal Chem* **13**:739-748
- Feldmann J (1997) Summary of a calibration method for the determination of volatile metal(loid) compounds in environmental gas samples by using gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* **12**:1069-1076
- Feldmann J, Hirner AV (1995) Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases. *Int J Environ An Ch* **60**:339-359
- Feldmann J, Grümping R, Hirner AV (1994) Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICP-MS. *Fresen J Anal Chem* **350**:228-234
- Fernandez RG, Bayon MM, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2000) Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **35**:639-646
- Franke S (2006) Validierung der Propylierung von Arsen, Antimon, Quecksilber und Zinn. *Diplomarbeit*, Universität Duisburg-Essen, Essen
- Geiszinger AE, Goessler W, Francesconi KA (2002) Biotransformation of arsenate to the tetramethylarsonium ion in the marine polychaetes *Nereis diversicolor* and *Nereis virens*. *Environ Sci Technol* **36**:2905-2910
- Gong ZL, Lu XF, Cullen WR, Le XC (2001) Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *J Anal Atom Spectrom* **16**:1409-1413

- Grandjean EM, Ducommun E, Gauthier G, Courvoisier B (1976) Bismuth-associated myoclonic encephalopathy. *Schweiz Med Wschr* **106**:1006-1011
- Gregus Z, Gyurasics A, Csanaky I (2000) Biliary and urinary excretion of inorganic arsenic: monomethylarsonous acid as a major biliary metabolite in rats. *Toxicol Sci* **56**:18-25
- Gross JH (2004) Electron Ionization. In: Gross JH (Ed) Mass spectrometry. Springer-Verlag, Berlin:193-222
- Grüter UM, Kresimon J, Hirner AV (2000) A new HG/LT-GC/ICP-MS multi-element speciation technique for real samples in different matrices. *Fresen J Anal Chem* **368**:67-72
- Halime Z, Michaudet L, Lachkar M, Brossier P, Boitrel B (2004) Influence of pendant arms bearing ligating groups on the structure of bismuth porphyrins: Implications for labeling immunoglobulins used in medical applications. *Bioconjugate Chem* **15**:1193-1200
- Hamasaki T, Nagase H, Yoshioka Y, Sato T (1995) Formation, distribution, and ecotoxicity of methylmetals of tin, mercury, and arsenic in the environment. *Crit Rev Env Sci Tec* **25**:45-91
- Hamilton EI, Minski MJ, Cleary JJ (1972) Problems concerning multi-element assay in biological materials. *Sci Total Environ* **1**:1-14
- Harada M (1995) Minamata Disease - Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* **25**:1-24.
- Harris HH, Pickering IJ, George GN (2004) The chemical form of mercury in fish - response. *Science* **303**:764-766
- Hassfjell S, Ingebrigtsen K, Bruland OS (2001) Synthesis, purification and biodistribution of ²⁰⁵Bi-DOTMP, visualizing bone deposition patterns with autoradiography. *Nucl Med Biol* **28**:425-433
- Hassfjell S, Brechbiel MW (2001) The development of the alpha-particle emitting radionuclides ²¹²Bi and ²¹³Bi, and their decay chain related radionuclides, for therapeutic applications. *Chem Rev* **101**:2019-2036

Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, Hirano S (2005) A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Arch Toxicol* **79**:183-191

Hespe W, Staal HJ, Hall DW (1988) Bismuth absorption from the colloidal subcitrate. *Lancet* **2**:1258

Heumann KG (2003) Calibration in elemental speciation analysis. In: Cornelis R, Caruso J, Crews H, Heumann K (Eds) Handbook of elemental speciation, techniques and methodology. Wiley, Chichester:547-562

Hillemand P, Cottet J, Cottet M (1976) General information on bismuth subnitrates. *Sem Hop Therapeut* **52**:514

Hillemand P, Cottet J (1976) Toxicity of bismuth subnitrate and regulation of its use in digestive-tract therapeutics. *Sem Hop Therapeut* **52**:514

Hillemand P, Palliere M, Laquais B, Bouvet P (1977) Bismuth treatment and blood bismuth levels. *Sem Hop* **53**:1663-1669

Hirner AV (2006) Speciation of alkylated metals and metalloids in the environment. *Anal Bioanal Chem* **385**:555-567

Hirner AV, Emons H (Eds) (2004) Organic metal and metalloid species in the environment. Analysis, distribution, processes and toxicological evaluation. Springer, Berlin

Hirner AV, Hartmann LM, Hippler J, Kresimon J, Koesters J, Michalke K, Sulkowski M, Rettenmeier AW (2004) Organometal(loid) compounds associated with human metabolism. In: Hirner AV, Emons H (Eds) Organic metal and metalloid species in the environment. Analysis, distribution, processes and toxicological evaluation. Springer, Berlin:181-203

Hochradel J (1928) Historisches zur Wismutfrace. *Munch Med Wschr* **128**:177-181

Hollmann M (2008) Synthese und Analytik von Bismutverbindungen mit biologisch relevanten Liganden. *Diplomarbeit*, Universität Duisburg-Essen, Essen

Holleman AF, Wiberg E (2007) Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de Gruyter, Berlin

Hudson M, Mowat NA (1989) Reversible toxicity in poisoning with colloidal bismuth subcitrate. *BMJ* **299**:159

Hübschmann HJ (Ed) (1996) Handbuch der GC/MS. Wiley-VCH, Weinheim

Hundal O, Bergseth M, Gharehnia B, Andersen KJ, Berstad A (1999) Absorption of bismuth from two bismuth compounds before and after healing of peptic ulcers. *Hepato-gastroenterol* **46**:2882-2886

Imam SK (2001) Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**:271-278

Islek I, Uysal S, Gok F, Dundaroz R, Kucukoduk S (2001) Reversible nephrotoxicity after overdose of colloidal bismuth subcitrate. *Pediatr Nephrol* **16**:510-514

Jaffe M (1886) Ueber den Neiderschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem* **10**:391-400

Janiak C (2007) Komplex-/Koordinationschemie. In: Riedel E (Ed) Moderne Anorganische Chemie. Walter de Gruyter, Berlin:381-579

Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* **3**:275-293

Jerzembeck W, Burger H, Constantin L, Margules L, Demaison J, Breidung J, Thiel W (2002) Bismuthine BiH₃: Fact or fiction? High-resolution infrared, millimeter-wave, and ab initio studies. *Angew Chem-Int Edit* **41**:2550-2552

Jost JP, Saluz HP (1993) DNA methylation: molecular biology and biology significance. Birkhäuser Verlag, Basel.

Jurcic JG (2001) Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* **38**:37-45

Kitchin KT (2001) Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharm* **172**:249-261

Kläntschi N, Lienemann P, Richner P, Vonmont H (1996) Elementanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Klotz U (2000) Pharmacokinetic considerations in the eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Pharmacokinet* **38**:243-270

Koch I, Feldmann J, Lintschinger J, Serves SV, Cullen WR, Reimer KJ (1998) Demethylation of trimethylantimony species in aqueous solution during analysis by hydride generation gas chromatography with AAS and ICP-MS detection. *Appl Organometal Chem* **12**:129-136

Koch KM, Kerr BM, Gooding AE, Davis IM (1996) Pharmacokinetics of bismuth and ranitidine following multiple doses of ranitidine bismuth citrate. *Br J Clin Pharmacol* **42**:207-211

Kösters J (2006) Qualitative und quantitative Speziesanalytik mittels simultaner EI-MS und ICP-MS Detektion nach gaschromatographischer Trennung. *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, Essen

Kösters J, Hippler J, Diaz-Bone RA, Hirner AV (2005) Parallel ICP-MS and EI-MS detection after GC separation as a unique tool for simultaneous identification and quantification of volatile heteroatomic organic compounds. *J Anal Atom Spectrom* **20**:996-999

Kozak RW, Atcher RW, Gansow OA, Friedman AM, Hines JJ, Waldmann TA (1986) Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: alpha-particle-emitting radionuclides as modalities for radioimmunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:474-478

Kraeutler B, Arigoni A, Golding BT (1999) Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins. Wiley-VCH, Weinheim

Lambert JR, Midolo P (1997) The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharm Therap* **11**:27-33

Le XC, Ma MS, Lu XF, Cullen WR, Aposhian HV, Zheng BS (2000) Determination of monomethylarsonous acid, a key arsenic methylation intermediate, in human urine. *Environ Health Persp* **108**:1015-1018

Le XC, Lu XF, Ma MS, Cullen WR, Aposhian HV, Zheng BS (2000) Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine. *Anal Chem* **72**:5172-5177

Le XC, Ma MS, Wong NA (1996) Speciation of arsenic compounds using high-performance liquid chromatography at elevated temperature and selective hydride generation atomic fluorescence detection. *Anal Chem* **68**:4501-4506

Lee SP, Lim TH, Pybus J, Clarke AC (1980) Tissue distribution of orally administered bismuth in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **7**:319-324

Leussink BT, Litvinov SV, de Heer E, Slikkerveer A, van der Voet GB, Bruijn JA, de Wolff FA (2001) Loss of homotypic epithelial cell adhesion by selective N-cadherin displacement in bismuth nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**:54-59

Leussink BT, Slikkerveer A, Engelbrecht MR, van der Voet GB, Nouwen EJ, de Heer E, de Broe ME, de Wolff FA, Bruijn JA (2001) Bismuth overdosing-induced reversible nephropathy in rats. *Arch Toxicol* **74**:745-754

Li JX, Waters SB, Drobna Z, Devesa V, Styblo M, Thomas DJ (2005) Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the inorganic arsenic methylation phenotype. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**:164-169

Li W, Jin L, Zhu N, Hou X, Deng F, Sun H (2003) Structure of colloidal bismuth subcitrate (CBS) in dilute HCl: unique assembly of bismuth citrate dinuclear units $[\text{Bi}(\text{cit})_2\text{Bi}]^{2-}$. *J Am Chem Soc* **125**:12408-12409

Lobinski R (1998) Speciation - targets, analytical solutions and markets. *Spectrochim Acta B* **53**:177-185

Locht LJ, Munkoe L, Stoltenberg M (2002) Bismuth tracing in organotypic cultures of rat hippocampus. *J Neurosci Methods* **115**:77-83

LO-Laboroptik (2005) www.lo-laboroptik.de

Lowe DJ (1974) Adverse effects of bismuth subgallate: a further report from the Australian Drug Evaluation Committee. *Med J Aust* **2**:664-666

Luppino MA, McLean AJ (1995) Plasma and tissue distribution of bismuth in normal and cirrhotic rats. *Analyst* **120**:883-886

Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT (2001) Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chem Res Toxicol* **14**:371-378

Marnell LL, Garcia-Vargas GG, Chowdhury UK, Zakharyan RA, Walsh B, Avram MD, Kopplin MJ, Cebrian ME, Silbergeld EK, Aposhian HV (2003) Polymorphisms in the human

monomethylarsonic acid (MMA V) reductase/hGSTO1 gene and changes in urinary arsenic profiles. *Chem Res Toxicol* **16**:1507-1513

Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-1315

Martin AJ, Synge RL (1941) A new form of chromatogram employing two liquid phases: a theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J* **35**:1358-1368

Martin FM, Donard OFX (1995) Aqueous ethylation of organotin compounds in simple solution for speciation analysis by cryofocusing and detection by atomic-absorption spectrometry - comparison with hydride generation. *Fresen J Anal Chem* **351**:230-236

Martin-Bouyer G, Nevot P, Singlas E, Foulon G, Philippon A, Duret M, Fievet MH, Clavel JP, Simon P (1981) Possible part of intestinal flora in bismuth intoxications. *Therapie* **36**:483-488

Martin-Bouyer G (1978) Poisoning by orally administered bismuth salts. *Gastroenterol Clin Biol* **2**:349-356

Martin-Bouyer G, Foulon G, Guerbois H, Barin C (1981) Epidemiological study of encephalopathies following bismuth administration per os. Characteristics of intoxicated subjects: comparison with a control group. *Clin Toxicol* **18**:1277-1283

Martinov MV, Vitvitsky VM, Mosharov EV, Banerjee R, Ataullakhanov FI (2000) A substrate switch: a new mode of regulation in the methionine metabolic pathway. *J Theor Biol* **204**:521-532

Matthews RG (2001) Cobalamin-dependent methyl transfers. *Biochemistry* **40**:8634-8635

Matthews RG (2001) Cobalamin-dependent methyltransferases. *Acc Chem Res* **34**:681-689

May TW, Wiedmeyer RH (1998) A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atom Spectrosc* **19**:150-155

McDevitt MR, Barendswaard E, Ma D, Lai L, Curcio MJ, Sgouros G, Ballangrud AM, Yang WH, Finn RD, Pellegrini V, Geerlings MW, Jr., Lee M, Brechbiel MW, Bander NH, Cordon-

Cardo C, Scheinberg DA (2000) An alpha-particle emitting antibody ([²¹³Bi]J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res* **60**:6095-6100

McDevitt MR, Finn RD, Ma D, Larson SM, Scheinberg DA (1999) Preparation of alpha-emitting ²¹³Bi-labeled antibody constructs for clinical use. *J Nucl Med* **40**:1722-1727

McDevitt MR, Finn RD, Sgouros G, Ma D, Scheinberg DA (1999) An ²²⁵Ac/²¹³Bi generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation. *Appl Radiat Isot* **50**:895-904

McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, Scheinberg DA (1998) Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* **25**:1341-1351

Menge H, Gregor M, Brosius B, Hopert R, Lang A (1992) Pharmacology of bismuth. *Eur J Gastroen Hepat* **4**:S41-S47

Merck Index (1989) 11th Edition, Merck, Rahway, U.S.A.:197

Merck Index (2006) 14th Edition, Merck, Whitehouse, NJ, USA, online version.

Meyer J, Schmidt A, Michalke K, Hensel R (2007) Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. *Syst Appl Microbiol* **30**:229-238

Michalke K, Schmidt A, Huber B, Meyer J, Sulkowski M, Hirner AV, Boertz J, Mosel F, Dammann P, Hilken G, Hedrich HJ, Dorsch M, Rettenmeier AW, Hensel R (2008) The role of intestinal microbiota in the transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Appl Environ Microbiol* **74**:3069-3075

Michalke K, Meyer J and Hensel R (2007) Methylation of metal(loid)s by methanoarchaea: Production of volatile derivatives with high ecotoxicological impact and health concern. In: Garrett RA, Klenk HP (Eds) *Archaea: Evolution, physiology, and molecular biology*. Blackwell Publishing:285-293

Michalke K, Meyer J, Hensel R (2006) Effect of octamethylcyclotetrasiloxane on methylation of bismuth by *Methanosarcina barkeri*. *Appl Environ Microbiol* **72**:6819-6821

Michalke K, Meyer J, Hirner AV, Hensel R (2002) Biomethylation of bismuth by the methanogen *Methanobacterium formicicum*. *Appl Organometal Chem* **16**:221-227

- Michalke K, Wickenheiser EB, Mehring M, Hirner AV, Hensel R (2000) Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. *Appl Environ Microbiol* **66**:2791-2796
- Mitschke K-H, Schmidtbaur H (1973) Pentamethylarsotane. *Chem Ber* **106**:3645-3651
- Molly K, Woestyne MV, Verstraete W (1993) Development of a 5-step multichamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biot* **39**:254-258
- Mühlenfeld KI (1999) Untersuchungen zur Biotransformation und Toxizität mit der Hepatomzelllinie HepG2 im Vergleich zu Primärkulturen der Wistarratte. *Dissertation*, Humboldt Universität, Berlin
- Mulford DA, Scheinberg DA, Jurcic JG (2005) The promise of targeted α -particle therapy. *J Nucl Med* **46 Suppl 1**:199S-204S
- Newton D, Talbot RJ, Priest ND (2001) Human biokinetics of injected bismuth-207. *Hum Exp Toxicol* **20**:601-609
- Nierenberg DW, Nordgren RE, Chang MB, Siegler RW, Blayney MB, Hochberg F, Toribara TY, Cernichiara E, Clarkson T (1998) Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. *N Engl J Med* **338**:1672-1676
- Nwokolo CU, Lewin JF, Hudson M, Pounder RE (1992) Transmucosal penetration of bismuth particles in the human stomach. *Gastroenterology* **102**:163-167
- Nwokolo CU, Prewett EJ, Sawyerr AM, Hudson M, Pounder RE (1991) The effect of histamine-H₂-receptor blockade on bismuth absorption from 3 ulcer-healing compounds. *Gastroenterology* **101**:889-894
- Nwokolo CU, Gavey CJ, Smith JT, Pounder RE (1989) The absorption of bismuth from oral doses of tripotassium dicitrato bismuthate. *Aliment Pharmacol Ther* **3**:29-39
- Palmieri Y (1993) Bismuth: The amazingly "green" environmentally-minded element. *Bull Bismuth Inst*, Sonderbeilage
- Pamphlett R, Danscher G, Rungby J, Stoltenberg M (2000) Tissue uptake of bismuth from shotgun pellets. *Environ Res* **82**:258-262

Pamphlett R, Stoltenberg M, Rungby J, Danscher G (2000) Uptake of bismuth in motor neurons of mice after single oral doses of bismuth compounds. *Neurotoxicol Teratol* **22**:559-563

Pearson RG (1973) Hard and soft acids and bases. Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, U.S.A.

Pettitt DJ, Helmkamp GK (1963) Stable oxonium salts and alkylation of episulfides and disulfides. *J Org Chem* **28**:2932-2933

Pipkin GA, Mills JG, Kler L, Dixon JS, Wood JR (1996) The safety of ranitidine bismuth citrate in controlled clinical studies. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **5**:399-407

Prange A, Jantzen E (1995) Determination of organometallic species by gas-chromatography inductively-coupled plasma-mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* **10**:105-109

Rao N, Feldman S (1990) Disposition of bismuth in the rat. I. Red blood cell and plasma protein binding. *Pharm Res* **7**:188-191

Rao N, Feldman S (1990) Disposition of bismuth in the rat. II. Pharmacokinetics and biliary excretion. *Pharm Res* **7**:237-241

Ribadeau-Dumas JL, Lechevalier B, Breteau M, Allain Y (1978) The intracerebral distribution of bismuth in bismuth encephalopathy. Pathological and toxicological study of 3 cases. *Nouv Presse Med* **7**:4021-4025

Rizvi SMA, Li Y, Song EYJ, Qu CF, Raja C, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ (2006) Preclinical studies of Bismuth-213 labeled plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI2) in a prostate cancer nude mouse xenograft model. *Cancer Biol Ther* **5**:386-393

Roberts E (1986) Alzheimer's disease may begin in the nose and may be caused by aluminosilicates. *Neurobiol Aging* **7**:561-567

Rochette EA, Bostick BC, Li GC, Fendorf S (2000) Kinetics of arsenate reduction by dissolved sulfide. *Environ Sci Tec* **34**:4714-4720

Ross JF, Broadwell RD, Poston MR, Lawhorn GT (1994) Highest brain bismuth levels and neuropathology are adjacent to fenestrated blood vessels in mouse brain after intraperitoneal dosing of bismuth subnitrate. *Toxicol Appl Pharmacol* **124**:191-200

Ross JF, Sahenk Z, Hyser C, Mendell JR, Alden CL (1988) Characterization of a murine model for human bismuth encephalopathy. *Neurotoxicology* **9**:581-586

Roy P, Saha A (2002) Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen. *Curr Sci India* **82**:38-45

Russ GA, Bigler RE, Tilbury RS, Woodard HQ, Laughlin JS (1975) Metabolic studies with radiobismuth. I. Retention and distribution of ^{206}Bi in the normal rat. *Radiat Res* **63**:443-454

Sadiq M (1997) Arsenic chemistry in soils: An overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water Air Soil Poll* **93**:117-136

Sampayo-Reyes A, Zakharyan RA, Healy SM, Aposhian HV (2000) Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue. *Chem Res Toxicol* **13**: 1181-1186

Slikkerveer A, de Wolff FA (1989) Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* **4**:303-323

Sollmann T, Seifter J (1939) Pharmacology of trimethylbismuth. *J Pharmacol* **67**:17-49

Steudel R, Holz B, Pickardt J (1989) Synthesis and structure of $[(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{TiS}_4\text{AsCH}_3]$ - a new reagent for the synthesis of sulfur-rich heterocycles. *Angew Chem Int Ed Engl* **28**:1269-1271

Stoltenberg M, Martiny M, Sorensen K, Rungby J, Krogfelt KA (2001) Histochemical tracing of bismuth in *Helicobacter pylori* after in vitro exposure to bismuth citrate. *Scand J Gastroenterol* **36**:144-148

Stoltenberg M, Schionning JD, Danscher G (2001) Retrograde axonal transport of bismuth: an autometallographic study. *Acta Neuropathol (Berl)* **101**:123-128

Stoltenberg M, Hogenhuis JA, Hauw JJ, Danscher G (2001) Autometallographic tracing of bismuth in human brain autopsies. *J Neuropath Exp Neur* **60**:705-710

Styblo M, Del Razo LM, LeCluyse EL, Hamilton GA, Wang CQ, Cullen WR, Thomas DJ (1999) Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* **12**:560-565

Suerbaum S, Michetti P (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* **347**:1175-1186

Sun H, Szeto KY (2003) Binding of bismuth to serum proteins: implication for targets of Bi(III) in blood plasma. *J Inorg Biochem* **94**:114-120

Sun H, Zhang L, Szeto KY (2004) Bismuth in medicine. *Met Ions Biol Syst* **41**:333-378

Sutton K, Sutton RM, Caruso JA (1997) Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **789**:85-126

Szpunar-Lobinska J, Witte C, Lobinski R, Adams FC (1995) Separation techniques in speciation analysis for organometallic species. *Fresen J Anal Chem* **351**: 351-377

Tao H, Murakami T, Tominaga M, Miyazaki A (1998) Mercury speciation in natural gas condensate by gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal Atom Spectrom* **13**:1085-1093

Tao H, Fatoki OS (1997) Biomethylation in natural environment. *Shigen to Kankyo* **6**:363-371

Thayer JS (2002) Biological methylation of less-studied elements. *Appl Organometal Chem* **16**:677-691

Thayer JS (1995) Environmental chemistry of the heavy elements: hydrido and organo compounds. VCH, New York

Thayer JS (1987) Kinetic studies on the reaction of methylcobalamin with metal oxides. *Appl Organometal Chem* **1**:545-554

Thayer JS (1984) Organometallic compounds and living organisms. Academic Press, New York

The World Medical Association (2007) Declaration of Helsinki. Online-Version, <http://www.wma.net>

Thews G, Schmidt RF (1995) Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, München

Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001) The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharm* **176**:127-144

Thomas DW, Sobecki S, Hartley TF, Coyle P, Alp MH (1983) Variable absorption and excretion of bismuth and its potential for toxicity. In: Brown SS, Savory J (Eds) Chemical toxicology and clinical chemistry of metals. Academic Press, London:391-394

Tietz NW (1995) Clinical guide to laboratory tests, 3rd edition. WB Saunders Company, Philadelphia:186-187

Tobe ML, Burgess J (1999) Inorganic Reaction Mechanisms. Addison Wesley Longmans, Essex

Treiber G, Walker S, Klotz U (1994) Omeprazole-induced increase in the absorption of bismuth from tripotassium dicitrate bismuthate. *Clin Pharmacol Ther* **55**:486-491

Vega L, Styblo M, Patterson R, Cullen W, Wang CQ, Germolec D (2001) Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Appl Pharm* **172**: 225-232

von Recklinghausen U, Rabieh S, Hippler J, Hirner AV, Rettenmeier AW, Dopp E (2008) Methylated bismuth, but not bismuth citrate or bismuth glutathione induces cyto- and genotoxic effects in human cells in vitro. *Chem Res Toxicol* **21**:1219–1228

Wagstaff AJ, Benfield P, Monk JP (1988) Colloidal bismuth subcitrate. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in peptic ulcer disease. *Drugs* **36**:132-157

Wallenhauer S, Seppelt K (1994) Methylbismuth(V) compounds. *Angew Chem Int Ed Engl* **33**:976-978

Watson RE, Goodman JI (2002) Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. *Toxicol Sci* **67**:11-16

Weber JH (1999) Volatile hydride and methyl compounds of selected elements formed in the marine environment. *Mar Chem* **65**:67-75

Wickenheiser EB, Michalke K, Drescher C, Hirner AV, Hensel R (1998) Development and application of liquid and gas-chromatographic speciation techniques with element specific (ICP-MS) detection to the study of anaerobic arsenic metabolism. *Fresen J Anal Chem* **362**:498-501

Wiesmüller GA (2007) Persönliche Mitteilung. Umweltprobenbank des Bundes - Teilbank Humanproben und Datenbank -, Universitätsklinikum Münster, Münster

Wildfang E, Radabaugh TR, Aposhian HV (2001) Enzymatic methylation of arsenic compounds. IX. Liver arsenite methyltransferase and arsenate reductase activities in primates. *Toxicology* **168**:213-221

Williams DR (1977) Analytical and computer-simulation studies of a colloidal bismuth citrate system used as an ulcer treatment. *J Inorg Nucl Chem* **39**:711-714

Wittig G, Torssell K (1953) Pentamethylarsenic and Pentamethylantimony. *Acta Chem Scand* **7**:1293-1301

Wong IHN (2001) Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication (Review). *Int J Oncol* **19**:1319-1324

Yang N, Sun H (2007) Biocoordination chemistry of bismuth: recent advances. *Coordin Chem Rev* **251**:2354-2366

Yu DH (1999) A physiologically based pharmacokinetic model of inorganic arsenic. *Regul Toxicol Pharm* **29**:128-141

Zakharyan RA, Aposhian HV (1999) Arsenite methylation by methylvitamin B₁₂ and glutathione does not require an enzyme. *Toxicol Appl Pharmacol* **154**:287-291

Zhang J, Lu R, Gu Z, Zhou G (2006) Inter-effect of toxicity on the combined medication of amoxicillin, metronidazole and colloidal bismuth subcitrate. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* **37**:559-561

Zhou ZS, Zhao G, Wan W (2001) Current developments in biological methylations. *Front Biotechnol Pharm* **2**:256-274

Zoorob GK, McKiernan JW, Caruso JA (1998) ICP-MS for elemental speciation studies. *Mikrochim Acta* **128**:145-168

11 Anhang

11.1 Umfang des Laborscreenings vor Studienbeginn

Hämatologie: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozyten

Gerinnung: TPZ (Quick-Wert), INR, aPTT

Klinische Chemie: Natrium, Kalium, Chlorid, Calcium, Phosphat (anorg.), Serum-Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Eisen, Billirubin (gesamt), Billirubin (direkt), GOT (ASAT), GPT (ALAT), AP, GGT, Gesamt-Eiweiß, CRP, Cholesterin (ges.), HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Glukose

Urinstatus: Urin-Stix-pH

Untersuchung auf pathogene und fakultativ pathogene Darmbakterien: Salmonella, Shigella, Yersinia enterocolitica, Serovan, Campylobacter

11.2 Die Basisdaten der Probanden

Tabelle 11-1: Detaillierte Daten zu den Teilnehmern der Probandenstudien

ID	Alter (Jahre)	Geschlecht (m/w)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m ²)	Raucher/ Nichtraucher	Studienzeiträume
001	26	m	74,0	23	Nichtraucher	15.-17.11.04
002	24	m	89,0	23	Nichtraucher	27.-29.10.04
004	31	m	92,0	30	Nichtraucher	27.-29.10.04
005/01	25	m	102,0	29	Nichtraucher	27.-29.10.04
005/02	27	m	102,0	29	Nichtraucher	28.02.-02.03.06
007	25	m	92,5	25	Nichtraucher	15.-17.11.04
008	25	m	79,5	22	Nichtraucher	15.-17.11.04
016	31	m	85,5	28	Nichtraucher	15.-17.11.04
101	25	m	68,0	19	Nichtraucher	30.05.-01.06.06
102	25	m	71,0	20	Nichtraucher	30.05.-01.06.06
103	25	m	93,0	31	Nichtraucher	30.05.-01.06.06
104	25	m	85,0	27	Nichtraucher	30.05.-01.06.06
105	31	m	85,0	29	Nichtraucher	12.-14.06.06
106	30	m	79,0	22	Nichtraucher	12.-14.06.06
107	29	m	82,0	23	Nichtraucher	12.-14.06.06
109	28	m	65,0	24	Nichtraucher	31.07.-02.08.06
111	27	m	98,0	26	Nichtraucher	31.07.-02.08.06
112	26	m	86,0	23	Nichtraucher	31.07.-02.08.06
113	28	m	73,0	23	Nichtraucher	25.-27.09.06
114	26	m	61,0	20	Nichtraucher	25.-27.09.06
115	31	m	90,0	26	Nichtraucher	25.-27.09.06
116	33	m	75,0	25	Nichtraucher	15.-20.01.07
116	34	m	75,0	25	Nichtraucher	14.-19.08.07
116	34	m	75,0	25	Nichtraucher	24.11.-01.12.07

11.3 Das Probenahmeprotokoll der Probandenstudie

Tag	-X	0							1		2	
Uhrzeit		8:30	9:00	9:30	10:00	11:00	13:00	17:00	9:00	17:00	9:00	17:00
Std.		-0,5	0	0,5	1	2	4	8	24	32	48	56
Probenart	Screening	10 Liter Atemluft vor 9:00	Verabreichung von 215 mg Bismut als Bismutsubcitrat		10 Liter Atemluft	10 Liter Atemluft	10 Liter Atemluft	10 Liter Atemluft	10 Liter Atemluft		10 Liter Atemluft	
		Blutprobe vor 9:00		Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe	Blutprobe
		Urinprobe vor 9:00		Spontanurinproben und Nachturin								
		Stuhlprobe vor 9:00		Stuhlproben								

Abbildung 11-1: Probenahmeprotokoll der Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora

11.4 Messergebnisse der Probandenstudie zur Bildung flüchtiger Bismut-Verbindungen im menschlichen Organismus unter Beteiligung der intestinalen Mikroflora

Tabelle 11-2: Bismut-Konzentrationen in Blutproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
001	15.11.04	09:00	0,0	< NWG	-
001	15.11.04	09:52	0,9	10,6	0,3
001	15.11.04	10:00	1,0	5,3	0,1
001	15.11.04	11:00	2,0	2,7	0,1
001	15.11.04	13:00	4,0	1,3	< 0,1
001	15.11.04	17:00	8,0	0,9	< 0,1
001	16.11.04	09:00	24,0	0,6	< 0,1
001	16.11.04	17:00	32,0	0,5	< 0,1
001	17.11.04	09:00	48,0	0,6	< 0,1
001	17.11.04	17:00	56,0	0,5	< 0,1
002	27.10.04	09:00	0,0	< NWG	-
002	27.10.04	09:30	0,5	45,6	1,2
002	27.10.04	10:00	1,0	26,0	1,0
002	27.10.04	11:00	2,0	10,3	< 0,1
002	27.10.04	13:00	4,0	5,3	0,2
002	27.10.04	17:00	8,0	2,8	0,1
002	28.10.04	09:00	24,0	-	-
002	28.10.04	17:00	32,0	1,3	< 0,1
002	29.10.04	09:00	48,0	1,3	0,1
002	29.10.04	17:00	56,0	1,2	< 0,1
004	27.10.04	09:00	0,0	< NWG	-
004	27.10.04	09:30	0,5	66,1	2,7
004	27.10.04	10:00	1,0	32,9	1,5
004	27.10.04	11:00	2,0	17,1	0,6
004	27.10.04	13:00	4,0	7,7	0,1
004	27.10.04	17:00	8,0	4,1	0,1
004	28.10.04	09:00	24,0	-	-
004	28.10.04	17:00	32,0	1,9	0,1
004	29.10.04	09:00	48,0	1,8	0,1
004	29.10.04	17:00	56,0	-	-
005/01	27.10.04	09:00	0,0	< NWG	-
005/01	27.10.04	09:30	0,5	1,3	0,2
005/01	27.10.04	10:00	1,0	1,1	< 0,1
005/01	27.10.04	11:00	2,0	-	-
005/01	27.10.04	13:00	4,0	0,4	0,1
005/01	27.10.04	17:00	8,0	0,2	< 0,1
005/01	28.10.04	09:00	24,0	0,1	< 0,1
005/01	28.10.04	17:00	32,0	0,1	< 0,1
005/01	29.10.04	09:00	48,0	< NWG	-
005/01	29.10.04	17:00	56,0	< NWG	-

Tabelle 10-2: Bismut-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
005/02	28.02.06	09:00	0,0	< NWG	-
005/02	28.02.06	09:30	0,5	1,9	0,1
005/02	28.02.06	10:00	1,0	1,6	< 0,1
005/02	28.02.06	11:00	2,0	1,2	0,1
005/02	28.02.06	13:00	4,0	0,7	< 0,1
005/02	28.02.06	17:00	8,0	0,3	< 0,1
005/02	01.03.06	09:00	24,0	0,2	< 0,1
005/02	01.03.06	17:00	32,0	0,2	< 0,1
005/02	02.03.06	09:00	48,0	0,2	< 0,1
005/02	02.03.06	17:00	56,0	0,2	< 0,1
007	15.11.04	09:00	0,0	< NWG	-
007	15.11.04	09:30	0,5	2,7	0,1
007	15.11.04	10:00	1,0	1,7	0,1
007	15.11.04	11:00	2,0	1,1	0,1
007	15.11.04	13:00	4,0	0,6	< 0,1
007	15.11.04	17:00	8,0	0,4	< 0,1
007	16.11.04	09:00	24,0	< NWG	-
007	16.11.04	17:00	32,0	< NWG	-
007	17.11.04	09:00	48,0	< NWG	-
007	17.11.04	17:00	56,0	< NWG	-
008	15.11.04	09:00	0,0	< NWG	-
008	15.11.04	09:30	0,5	7,9	< 0,1
008	15.11.04	10:00	1,0	7,1	< 0,1
008	15.11.04	11:00	2,0	4,2	0,5
008	15.11.04	13:00	4,0	2,6	< 0,1
008	15.11.04	17:00	8,0	1,4	< 0,1
008	16.11.04	09:00	24,0	0,5	< 0,1
008	16.11.04	17:00	32,0	0,4	< 0,1
008	17.11.04	09:00	48,0	0,4	0,1
008	17.11.04	17:00	56,0	0,3	< 0,1
016	15.11.04	09:00	0,0	< NWG	-
016	15.11.04	09:30	0,5	9,3	< 0,1
016	15.11.04	10:00	1,0	5,5	0,2
016	15.11.04	11:00	2,0	4,0	0,1
016	15.11.04	13:00	4,0	1,9	< 0,1
016	15.11.04	17:00	8,0	0,9	< 0,1
016	16.11.04	09:00	24,0	0,8	< 0,1
016	16.11.04	17:00	32,0	0,6	0,1
016	17.11.04	09:00	48,0	0,6	< 0,1
016	17.11.04	17:00	56,0	0,6	< 0,1
101	30.05.06	09:00	0,0	< NWG	-
101	30.05.06	09:30	0,5	17,6	0,8
101	30.05.06	10:00	1,0	10,7	0,3
101	30.05.06	11:00	2,0	6,1	0,4
101	30.05.06	13:00	4,0	3,2	0,2
101	30.05.06	17:00	8,0	1,7	0,1
101	31.05.06	09:00	24,0	0,7	< 0,1
101	31.05.06	17:00	32,0	0,6	< 0,1
101	01.06.06	09:00	48,0	0,6	< 0,1
101	01.06.06	17:00	56,0	0,6	< 0,1

Tabelle 10-2: Bismut-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
102	30.05.06	09:00	0,0	< NWG	-
102	30.05.06	09:30	0,5	2,4	0,1
102	30.05.06	10:00	1,0	2,3	< 0,1
102	30.05.06	11:00	2,0	1,4	0,1
102	30.05.06	13:00	4,0	0,7	< 0,1
102	30.05.06	17:00	8,0	0,4	< 0,1
102	31.05.06	09:00	24,0	0,3	< 0,1
102	31.05.06	17:00	32,0	0,2	< 0,1
102	01.06.06	09:00	48,0	0,2	< 0,1
102	01.06.06	17:00	56,0	0,2	< 0,1
103	30.05.06	09:00	0,0	< NWG	-
103	30.05.06	09:30	0,5	12,5	0,5
103	30.05.06	10:00	1,0	7,4	0,2
103	30.05.06	11:00	2,0	4,5	0,1
103	30.05.06	13:00	4,0	2,3	0,1
103	30.05.06	17:00	8,0	1,5	< 0,1
103	31.05.06	09:00	24,0	0,7	< 0,1
103	31.05.06	17:00	32,0	0,6	< 0,1
103	01.06.06	09:00	48,0	0,5	< 0,1
103	01.06.06	17:00	56,0	0,6	< 0,1
104	30.05.06	09:00	0,0	< NWG	-
104	30.05.06	09:30	0,5	7,4	0,1
104	30.05.06	10:00	1,0	4,5	0,2
104	30.05.06	11:00	2,0	2,7	0,1
104	30.05.06	13:00	4,0	1,3	< 0,1
104	30.05.06	17:00	8,0	0,8	< 0,1
104	31.05.06	09:00	24,0	0,3	< 0,1
104	31.05.06	17:00	32,0	0,3	< 0,1
104	01.06.06	09:00	48,0	0,2	< 0,1
104	01.06.06	17:00	56,0	0,2	< 0,1
105	12.06.06	09:00	0,0	< NWG	-
105	12.06.06	09:30	0,5	24,0	0,7
105	12.06.06	10:00	1,0	15,2	0,6
105	12.06.06	11:00	2,0	7,8	0,2
105	12.06.06	12:45	4,0	5,4	0,1
105	12.06.06	17:00	8,0	3,1	0,1
105	13.06.06	09:00	24,0	2,1	0,1
105	13.06.06	17:00	32,0	1,8	0,1
105	14.06.06	09:00	48,0	1,9	0,1
105	14.06.06	17:00	56,0	2,0	0,1
106	12.06.06	09:00	0,0	< NWG	-
106	12.06.06	09:30	0,5	5,9	0,2
106	12.06.06	10:00	1,0	4,1	< 0,1
106	12.06.06	10:45	2,0	2,9	< 0,1
106	12.06.06	12:45	4,0	1,6	< 0,1
106	12.06.06	17:00	8,0	0,9	< 0,1
106	13.06.06	09:00	24,0	0,5	< 0,1
106	13.06.06	17:00	32,0	0,5	< 0,1
106	14.06.06	09:00	48,0	0,5	< 0,1
106	14.06.06	17:00	56,0	0,4	< 0,1

Tabelle 10-2: Bismut-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
107	12.06.06	09:00	0,0	< NWG	-
107	12.06.06	09:30	0,5	5,9	0,1
107	12.06.06	10:00	1,0	3,1	0,1
107	12.06.06	11:00	2,0	1,7	0,1
107	12.06.06	13:00	4,0	1,0	< 0,1
107	12.06.06	17:00	8,0	0,6	< 0,1
107	13.06.06	09:00	24,0	0,3	< 0,1
107	13.06.06	17:00	32,0	0,3	< 0,1
107	14.06.06	09:00	48,0	0,3	< 0,1
107	14.06.06	17:00	56,0	0,2	< 0,1
109	31.07.06	09:00	0,0	< NWG	-
109	31.07.06	09:30	0,5	7,0	0,1
109	31.07.06	10:00	1,0	4,1	0,
109	31.07.06	11:00	2,0	2,5	0,1
109	31.07.06	13:00	4,0	1,3	0,1
109	31.07.06	17:00	8,0	0,7	< 0,1
109	01.08.06	09:00	24,0	0,4	< 0,1
109	01.08.06	17:00	32,0	0,4	< 0,1
109	01.08.06	09:00	48,0	0,4	< 0,1
109	01.08.06	17:00	56,0	0,3	< 0,1
111	31.07.06	09:00	0,0	< NWG	-
111	31.07.06	09:30	0,5	1,7	< 0,1
111	31.07.06	10:00	1,0	1,2	< 0,1
111	31.07.06	11:00	2,0	1,1	< 0,1
111	31.07.06	13:00	4,0	0,6	< 0,1
111	31.07.06	17:00	8,0	0,5	< 0,1
111	01.08.06	09:00	24,0	0,3	< 0,1
111	01.08.06	17:00	32,0	0,2	< 0,1
111	01.08.06	09:00	48,0	0,2	< 0,1
111	01.08.06	17:00	56,0	0,2	< 0,1
112	31.07.06	09:00	0,0	< NWG	-
112	31.07.06	09:30	0,5	5,1	0,2
112	31.07.06	10:00	1,0	2,7	0,1
112	31.07.06	11:00	2,0	1,5	0,1
112	31.07.06	13:00	4,0	0,9	< 0,1
112	31.07.06	17:00	8,0	0,5	< 0,1
112	01.08.06	09:00	24,0	0,3	< 0,1
112	01.08.06	17:00	32,0	0,2	< 0,1
112	01.08.06	09:00	48,0	0,2	< 0,1
112	01.08.06	17:00	56,0	0,2	< 0,1
113	25.09.06	09:00	0,0	< NWG	-
113	25.09.06	09:30	0,5	20,2	0,8
113	25.09.06	10:00	1,0	11,3	0,2
113	25.09.06	11:00	2,0	6,7	0,1
113	25.09.06	13:00	4,0	4,6	0,1
113	25.09.06	17:00	8,0	2,4	< 0,1
113	26.09.06	09:00	24,0	1,5	0,1
113	26.09.06	17:00	32,0	1,4	< 0,1
113	27.09.06	09:00	48,0	1,3	0,1
113	27.09.06	17:00	56,0	1,6	0,3

Tabelle 10-2: Bismut-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
114	25.09.06	09:00	0,0	< NWG	-
114	25.09.06	09:30	0,5	158,8	1,7
114	25.09.06	10:00	1,0	75,7	1,7
114	25.09.06	10:45	1,8	32,3	0,4
114	25.09.06	12:45	3,8	18,4	1,7
114	25.09.06	17:00	8,0	8,1	0,2
114	26.09.06	09:00	24,0	4,6	0,1
114	26.09.06	17:00	32,0	4,1	0,1
114	27.09.06	09:00	48,0	4,1	0,1
114	27.09.06	17:00	56,0	3,6	0,1
115	25.09.06	09:00	0,0	< NWG	-
115	25.09.06	09:30	0,5	13,7	0,1
115	25.09.06	10:00	1,0	7,0	0,2
115	25.09.06	11:00	2,0	3,3	< 0,1
115	25.09.06	13:00	4,0	1,8	0,1
115	25.09.06	17:00	8,0	1,1	< 0,1
115	26.09.06	09:00	24,0	0,4	< 0,1
115	26.09.06	17:00	32,0	0,4	< 0,1
115	27.09.06	09:00	48,0	0,4	< 0,1
115	27.09.06	17:00	56,0	0,3	< 0,1

Tabelle 11-3: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
001	15.11.04	09:15	0,3	-	257,9	< NWG	-	-
001	15.11.04	13:25	4,4	250	126,1	61	1	0,0000483
001	15.11.04	16:44	7,7	400	146,2	120	10	0,0000821
001	16.11.04	07:00	22,0	400	143,1	61	1	0,0000423
001	16.11.04	20:00	35,0	250	206,0	54	1	0,0000262
002	27.10.04	08:30	0,0	-	201,6	< NWG	-	-
002	27.10.04	15:30	6,5	320	45,2	626	14	0,0013856
002	27.10.04	17:13	8,2	250	145,1	2594	1	0,0017875
002	28.10.04	12:50	27,8	300	160,6	97	1	0,0000604
002	28.10.04	16:53	31,9	390	109,5	44	2	0,0000399
002	28.10.04	09:00	48,0	700	198,5	80	1	0,0000405
004	27.10.04	08:30	0,0	-	126,9	< NWG	-	-
004	27.10.04	15:55	6,9	400	146,7	1784	18	0,0012159
004	28.10.04	14:50	29,8	720	101,7	101	9	0,0000993
004	28.10.04	22:10	37,2	440	172,2	81	1	0,0000470
004	29.10.04	06:50	45,8	410	214,0	148	3	0,0000692

Tabelle 10-3: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
005/01	27.10.04	08:53	0,0	-	-	< NWG	-	-
005/01	27.10.04	10:58	3,0	-	-	160	1	-
005/01	27.10.04	15:10	6,2	-	-	63	< 1	-
005/01	27.10.04	21:32	12,5	-	-	28	< 1	-
005/01	27.10.04	22:11	13,2	-	-	7	< 1	-
005/01	28.10.04	07:23	22,4	-	-	36	< 1	-
005/01	28.10.04	14:22	28,4	-	-	51	< 1	-
005/01	28.10.04	16:40	30,7	-	-	16	1	-
005/01	28.10.04	20:06	35,1	-	-	19	< 1	-
005/01	28.10.04	21:25	36,4	-	-	4	< 1	-
005/01	29.10.04	07:10	46,2	-	-	21	< 1	-
005/01	29.10.04	16:40	57,7	-	-	12	< 1	-
005/02	28.02.06	08:10	0,0	-	153,6	< NWG	-	-
005/02	28.02.06	10:05	1,1	120	92,3	105	4	0,0001133
005/02	28.02.06	11:05	2,1	500	110,0	110	1	0,0001004
005/02	28.02.06	12:50	4,2	200	109,1	81	< 1	0,0000740
005/02	28.02.06	14:25	5,4	150	87,1	42	< 1	0,0000488
005/02	28.02.06	16:21	7,4	230	30,6	10	< 1	0,0000320
005/02	28.02.06	19:15	10,3	170	64,5	17	< 1	0,0000260
005/02	02.03.06	08:05	23,1	300	240,2	34	< 1	0,0000097
005/02	02.03.06	12:50	26,9	550	34,8	6	< 1	0,0000093
005/02	01.03.06	08:05	29,5	450	262,3	8	< 1	0,0000130
005/02	01.03.06	11:52	47,1	270	47,4	23	< 1	0,0000131
005/02	01.03.06	16:00	51,8	270	61,3	3	< 1	0,0000123
007	15.11.04	07:20	0,0	-	59,6	< NWG	-	-
007	15.11.04	10:06	1,1	200	117,1	74	< 1	0,0000635
007	15.11.04	11:30	2,5	125	91,5	100	1	0,0001094
007	15.11.04	14:00	5,0	150	144,5	65	1	0,0000449
007	15.11.04	16:14	7,2	200	89,0	28	< 1	0,0000310
007	15.11.04	18:09	9,2	120	129,6	28	< 1	0,0000220
007	15.11.04		15,5	600	103,5	20	< 1	0,0000190
007	16.11.04	06:25	21,4	600	86,2	12	< 1	0,0000145
007	16.11.04	11:20	26,3	150	227,5	23	< 1	0,0000101
007	16.11.04	14:15	29,3	200	148,1	14	< 1	0,0000097
007	16.11.04	15:45	30,8	150	92,8	9	< 1	0,0000100
007	16.11.04	18:25	33,4	150	145,8	13	< 1	0,0000086
007	16.11.04	23:10	38,2	40	390,4	39	1	0,0000099
007	17.11.04	07:15	46,3	250	244,1	21	< 1	0,0000086
007	17.11.04	11:40	50,7	100	387,6	22	< 1	0,0000057
007	17.11.04	15:45	54,8	200	293,3	14	< 1	0,0000049
008	15.11.04	08:30	0,0	-	371,4	< NWG	-	-
008	15.11.04	11:10	2,2	150	30,3	312	44	0,0010294
008	15.11.04	13:40	4,7	300	52,4	146	< 1	0,0002778
008	15.11.04	18:26	9,4	300	193,7	216	< 1	0,0001117
008	15.11.04		18,5	550	174,0	150	< 1	0,0000864
008	16.11.04	12:25	27,4	300	57,0	44	< 1	0,0000766
008	16.11.04	17:30	32,5	350	233,6	25	< 1	0,0000107
008	17.11.04	06:30	45,5	550	96,7	33	< 1	0,0000342
008	17.11.04	16:30	55,5	400	184,2	31	< 1	0,0000169

Tabelle 10-3: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
016	15.11.04	05:40	0	-	-	< NWG	-	-
016	15.11.04	12:05	3,1	-	-	436	29	-
016	15.11.04	16:05	7,1	-	-	176	1	-
016	15.11.04	19:50	10,8	-	-	98	1	-
016	16.11.04	05:40	20,7	-	-	100	< 1	-
016	16.11.04	08:40	23,7	-	-	25	< 1	-
016	16.11.04	15:40	30,7	-	-	28	< 1	-
016	17.11.04	05:20	44,3	-	-	47	< 1	-
016	17.11.04	14:30	53,5	-	-	23	< 1	-
101	30.05.06	09:00	0,0	50	112,8	< NWG	-	-
101	30.05.06	13:00	4,0	350	96,8	739	7	0,0007630
101	30.05.06	15:45	6,8	700	25,9	73	1	0,0002806
101	30.05.06	16:30	7,5	250	25,1	51	< 1	0,0002039
101	30.05.06	19:00	11,0	600	29,9	47	< 1	0,0001556
101	30.05.06	22:15	13,3	650	32,7	38	1	0,0001168
101	31.05.06	00:30	15,5	750	8,5	17	< 1	0,0001989
101	31.05.06	07:45	22,8	400	114,3	82	1	0,0000714
101	31.05.06	15:00	30,0	600	91,3	43	4	0,0000472
101	31.05.06	20:45	35,8	1300	31,3	16	1	0,0000508
101	31.05.06	22:15	37,3	350	31,8	15	< 1	0,0000484
101	01.06.06	06:45	45,8	800	84,8	28	1	0,0000324
101	01.06.06	13:15	52,3	600	68,6	30	< 1	0,0000435
101	01.06.06	16:00	55,0	200	56,8	23	< 1	0,0000397
101	01.06.06	21:00	60,0	1200	28,6	11	< 1	0,0000389
101	01.06.06	22:30	61,5	100	77,8	30	< 1	0,0000379
101	02.06.06	09:35	72,6	500	112,8	42	< 1	0,0000369
102	30.05.06	11:10	2,2	300	266,2	83	1	0,0000313
102	30.05.06	13:00	4,0	100	111,7	45	1	0,0000403
102	30.05.06	16:55	7,9	325	106,1	28	< 1	0,0000263
102	31.05.06	09:00	24,0	300	172,3	19	< 1	0,0000112
102	31.05.06	12:20	27,3	300	64,0	8	< 1	0,0000122
102	31.05.06	17:00	32,0	350	165,0	10	< 1	0,0000063
102	01.06.06	08:00	47,0	350	191,8	15	< 1	0,0000077
102	01.06.06	15:15	54,3	500	161,0	10	< 1	0,0000060
103	30.05.06	09:00	0,0	400	168,6	< NWG	-	-
103	30.05.06	16:00	7,5	550	151,8	46	< 1	0,0000302
103	30.05.06	18:15	9,8	500	116,2	133	2	0,0001143
103	30.05.06	23:40	15,2	700	169,8	114	1	0,0000671
103	31.05.06	09:00	24,5	400	141,3	74	< 1	0,0000525
103	31.05.06	12:10	27,7	400	157,4	57	6	0,0000363

Tabelle 10-3: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
104	30.05.06	09:00	0,0	-	162,5	< NWG	-	-
104	30.05.06	13:00	4,0	-	141,3	170	1	0,0001202
104	30.05.06	17:05	8,1	-	90,9	53	1	0,0000579
104	30.05.06	18:15	9,3	-	248,7	290	2	0,0001166
104	31.05.06	13:00	28,0	-	127,3	16	< 1	0,0000124
105	12.06.06	09:00	0,0	400	273,8	< NWG	-	-
105	12.06.06	10:51	1,9	200	133,3	2329	43	0,0017472
105	12.06.06	12:40	3,7	200	43,8	286	4	0,0006523
105	12.06.06	18:20	9,3	400	100,6	158	5	0,0001575
105	13.06.06	13:00	28,0	500	105,9	73	1	0,0000685
105	13.06.06	15:00	30,0	400	114,8	90	2	0,0000785
105	14.06.06	08:00	47,0	400	154,5	75	1	0,0000483
105	14.06.06	14:30	53,5	400	118,0	44	1	0,0000376
105	14.06.06	17:00	56,0	400	111,7	23	1	0,0000208
106	12.06.06	08:30	0,0	-	36,8	< NWG	-	-
106	12.06.06	10:00	1,0	-	25,5	60	1	0,0002360
106	12.06.06	19:00	10,0	-	121,3	67	2	0,0000552
106	13.06.06	06:30	21,5	-	270,1	66	1	0,0000245
106	13.06.06	09:00	24,0	-	40,0	6	< 1	0,0000161
106	13.06.06	19:00	34,0	-	201,1	26	1	0,0000128
106	14.06.06	16:00	55,0	-	137,9	13	< 1	0,0000098
107	12.06.06	08:30	0,0	95	114,3	< NWG	-	-
107	12.06.06	11:15	2,3	180	135,8	280	12	0,0002063
107	12.06.06	15:30	6,5	720	58,2	33	1	0,0000566
107	12.06.06	19:00	10,0	440	91,8	35	3	0,0000379
107	12.06.06	22:00	13,0	200	157,2	46	< 1	0,0000292
107	13.06.06	04:30	19,5	360	176,4	30	1	0,0000171
107	13.06.06	08:30	23,5	120	137,6	24	< 1	0,0000177
107	13.06.06	15:00	30,0	-	165,8	29	1	0,0000176
107	13.06.06	20:30	35,5	180	242,1	42	1	0,0000172
107	13.06.06	23:30	38,5	200	195,0	20	< 1	0,0000103
107	14.06.06	08:00	47,0	250	265,6	39	2	0,0000147
107	14.06.06	13:00	52,0	250	237,9	25	1	0,0000104
107	14.06.06	16:15	55,3	180	206,8	19	< 1	0,0000091
109	31.07.06	08:30	0,0	300		< NWG	-	-
109	31.07.06	13:35	4,6	200	171,2	207	2	0,0001211
109	31.07.06	15:15	6,3	240	66,9	42	1	0,0000631
109	01.08.06	03:15	18,3	450	197,4	73	5	0,0000370
109	01.08.06	09:00	24,0	100	377,9	111	2	0,0000293
109	01.08.06	17:18	31,3	150	111,6	19	< 1	0,0000172
109	02.08.06	01:55	40,9	300	243,6	32	< 1	0,0000131
109	02.08.06	06:50	45,8	160	238,3	38	1	0,0000159
109	02.08.06	16:00	55,0	450	57,7	7	< 1	0,0000118

Tabelle 10-3: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
111	31.07.06	09:00	0,0	600	51,0	< NWG	-	-
111	31.07.06	09:55	0,9	850	17,7	15	< 1	0,0000841
111	31.07.06	11:28	2,5	600	22,5	22	< 1	0,0000984
111	31.07.06	12:05	3,1	550	17,5	13	< 1	0,0000719
111	31.07.06	14:30	5,5	1250	14,2	8	< 1	0,0000574
111	31.07.06	16:19	7,3	600	13,7	5	< 1	0,0000395
111	31.07.06	17:30	8,5	700	16,1	5	< 1	0,0000285
111	31.07.06	19:14	10,2	500	30,0	7	< 1	0,0000245
111	31.07.06	20:17	11,3	450	18,9	5	< 1	0,0000243
111	31.07.06	23:30	14,5	1100	22,2	4	< 1	0,0000189
111	01.08.06	07:38	22,6	1500	43,6	6	< 1	0,0000140
111	01.08.06	08:46	23,8	350	32,7	4	< 1	0,0000114
111	01.08.06	09:27	24,5	550	13,4	1	< 1	0,0000076
111	01.08.06	09:31	24,5	550	12,3	2	< 1	0,0000138
111	01.08.06	10:23	25,4	500	12,6	2	< 1	0,0000138
111	01.08.06	11:36	26,6	750	20,3	2	< 1	0,0000098
111	01.08.06	13:50	28,8	450	19,2	2	< 1	0,0000085
111	01.08.06	14:53	29,9	600	13,1	1	< 1	0,0000089
111	01.08.06	16:00	31,0	600	19,6	2	< 1	0,0000102
111	01.08.06	16:42	31,7	500	12,9	1	< 1	0,0000090
111	01.08.06	18:00	33,0	600	20,6	2	< 1	0,0000078
111	01.08.06	19:20	34,3	500	22,7	2	< 1	0,0000080
111	01.08.06	20:38	35,6	350	22,8	2	< 1	0,0000076
111	02.08.06	07:45	46,8	1950	40,7	3	< 1	0,0000077
111	02.08.06	09:59	49,0	750	28,1	2	< 1	0,0000070
111	02.08.06	12:18	51,3	1050	19,8	1	< 1	0,0000058
111	02.08.06	13:12	52,2	750	15,2	1	< 1	0,0000048
111	02.08.06	14:15	53,3	600	18,3	1	< 1	0,0000052
111	02.08.06	16:18	55,3	1100	13,7	1	< 1	0,0000051
112	31.07.06	08:48	0,0	45	205,6	< NWG	-	-
112	31.07.06	13:35	4,6	500	177,6	247	8	0,0001389
112	31.07.06	23:20	14,3	200	162,4	41	1	0,0000252
112	01.08.06	06:10	21,2	460	129,5	27	< 1	0,0000206
112	02.08.06	06:10	45,2	300	229,9	28	< 1	0,0000121
112	02.08.06	16:45	55,8	400	174,9	16	< 1	0,0000092
113	25.09.06	08:45	0,0	-	146,0	< NWG	-	-
113	25.09.06	10:16	1,3	-	154,7	1545	56	0,0009987
113	25.09.06	11:25	2,4	-	76,5	514	14	0,0006720
113	25.09.06	16:55	7,9	-	100,4	172	6	0,0001715
113	25.09.06	19:00	10,0	-	37,3	49	1	0,0001308
113	25.09.06	21:05	12,1	-	54,8	47	1	0,0000866
113	26.09.06	08:00	23,0	-	236,5	141	2	0,0000597
113	27.09.06	12:40	51,7	-	77,8	31	1	0,0000404
113	27.09.06	16:20	55,3	-	117,8	39	1	0,0000334

Tabelle 10-3: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
114	25.09.06	08:30	0,0	20	182,5	< NWG	-	-
114	25.09.06	10:07	1,1	100	150,4	12795	149	0,0085073
114	25.09.06	11:00	2,0	200	100,0	3092	44	0,0030915
114	25.09.06	13:05	4,1	150	35,0	677	7	0,0019330
114	25.09.06	14:05	5,1	220	35,8	465	4	0,0012997
114	25.09.06	14:15	5,3	100	12,2	139	3	0,0011410
114	25.09.06	21:25	12,4	375	85,6	275	58	0,0003213
114	26.09.06	06:55	21,9	350	155,3	340	< 1	0,0002191
114	27.09.06	15:10	54,2	320	21,8	173	3	0,0007933
114	27.09.06	17:00	64,0	300	55,0	375	7	0,0006820
115	25.09.06	08:30	0,0	350	182,4	< NWG	-	-
115	25.09.06	10:00	1,0	270	78,0	264	7	0,0003383
115	25.09.06	11:15	2,3	600	92,5	200	5	0,0002158
115	25.09.06	13:00	4,0	400	108,6	71	2	0,0000655
115	25.09.06	14:45	5,8	250	25,5	20	1	0,0000787
115	25.09.06	17:00	8,0	250	59,7	32	< 1	0,0000530
115	25.09.06	23:00	14,0	400	52,1	40	< 1	0,0000774
115	26.09.06	09:00	24,0	230	55,3	15	< 1	0,0000277
115	27.09.06	12:30	51,5	700	61,6	11	< 1	0,0000176
115	27.09.06	14:00	53,0	300	105,2	6	< 1	0,0000056

Tabelle 11-4: Zeiträume und Massen des renal eliminierten Bismuts

ID	0-12 h (µg)	12,1-24 h (µg)	24,1-36 h (µg)	36,1-48 h (µg)	48,1-56 h (µg)	Σ (µg)	% 0-12 h	% von 215 mg Bi
001	63	24	13	-	-	101	62	0,05
002	848	-	46	-	56	951	89	0,44
004	713	-	73	97	-	882	81	0,41
005/01	95	10	6	6	1	120	79	0,06
005/02	-	-	-	-	-	-	-	-
007	47	19	9	7	5	87	54	0,04
008	156	83	22	18	12	291	54	0,14
016	-	-	-	-	-	-	-	-
101	350	71	26	48	60	554	63	0,26
102	38	-	12	5	5	60	63	0,03
103	91	80	53	-	-	224	41	0,10
104	-	-	-	-	-	-	-	-
105	586	-	72	30	27	716	82	0,33
106	-	-	-	-	-	-	-	-
107	89	23	7	14	9	143	62	0,07
109	51	33	14	16	3	117	44	0,05
111	55	14	11	7	6	91	60	0,04
112	123	20	-	8	7	158	78	0,07
113	-	-	-	-	-	-	-	-
114	2115	222	-	-	168	2506	84	1,17
115	232	16	4	-	10	261	89	0,05

Tabelle 11-5: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben

ID	Datum	Uhrzeit	Stunden (h)	Bismut (mg/kg)	SD
001	15.11.04	09:15	0,3	0,03	< 0,01
001	15.11.04	18:17	9,3	0,06	< 0,01
002	Vorprobe	-	0,0	< NWG	-
002	27.10.04	15:30	6,5	0,88	0,31
002	28.10.04	12:52	27,9	539	146
002	28.10.04	20:00	35,0	626	38
004	Vorprobe	-	0,0	< 0,01	< 0,01
004	27.10.04	15:55	6,9	0,01	1
004	29.10.04	06:30	45,5	245	28
005/01	27.10.04	13:02	4,0	1,01	0,05
005/01	27.10.04	18:05	9,1	3,09	0,20
005/01	27.10.04	21:35	12,6	294	36
005/02	28.02.06	Keine Angabe	-	< NWG	-
005/02	01.03.06	Keine Angabe	-	736	38
005/02	02.03.06	Keine Angabe	-	239	39
007	15.11.04	11:36	2,6	< 0,01	< 0,01
007	15.11.04	15:36	6,6	134	19
007	16.11.04	14:15	29,3	890	252
007	17.11.04	11:40	50,7	199	36
008	Keine Proben	-	-	-	-
016	15.11.04	06:15	0,0	< NWG	0
016	16.11.04	06:25	21,4	672	1
016	16.11.04	11:55	26,9	590	39
016	17.11.04	07:15	46,3	112	7
101	31.05.06	07:45	23,8	358	80
101	01.06.06	07:00	46,0	252	42
102	31.05.06	08:30	23,5	603	46
103	30.05.06	13:00	4,0	21	7
103	31.05.06	00:10	15,2	481	67
103	31.05.06	08:30	23,5	525	14
104	Keine Proben	-	-	-	-
105	12.06.06	Vorprobe	0,0	< NWG	-
105	12.06.06	11:15	2,3	< NWG	-
105	12.06.06	21:00	12,0	688	35
105	13.06.06	13:00	28,0	46	43
105	14.06.06	14:30	53,5	24	6
106	12.06.06	Vorprobe	0,0	< NWG	-
106	13.06.06	07:00	22,0	< NWG	-
106	13.06.06	21:00	36,0	787	12
107	13.06.06	06:30	21,5	83	13
107	14.06.06	08:00	47,0	21	11
109	31.07.06	08:10	0,0	< NWG	-
109	31.07.06	15:15	6,3	< NWG	-
109	02.07.06	09:30	48,5	324	121
109	02.07.06	16:55	55,9	0,5	< 0,01
111	30.07.06	10:48	0,0	< NWG	-
111	31.07.06	20:17	35,3	< NWG	-
111	01.08.06	08:14	23,2	168	10
111	01.08.06	13:50	28,8	78	20
111	01.08.06	20:38	35,6	123	6
111	01.08.06	22:30	37,5	85	15

Tabelle 10-5: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Stunden (h)	Bismut (mg/kg)	SD
112	31.07.06	08:40	0,0	< NWG	-
112	31.07.06	14:25	5,4	246	20
112	01.08.06	14:50	29,8	438	40
112	Keine Angabe	-	-	250	10
113	24.09.06	00:40	0,0	< NWG	-
113	25.09.06	11:50	2,8	0	< 0,01
113	25.09.06	17:10	8,2	0	< 0,01
113	26.09.06	08:00	23,0	3	1
113	27.09.06	00:40	39,7	1408	35
113	27.09.06	12:40	51,7	268	11
114	Keine Angabe	-	-	< NWG	-
114	Keine Angabe	-	-	8	< 0,01
114	26.09.06	09:00	24,0	2056	183
114	26.09.06	Keine Angabe	-	2356	123
114	27.09.06	11:55	50,9	275	17
115	Vorprobe	-	0,0	< NWG	-
115	26.09.06	07:30	22,5	3	2
115	27.09.06	15:30	54,5	1632	< 0,01

Tabelle 11-6: (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Atemluftproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	(CH ₃) ₃ Bi (ng/m ³)	SD
001	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
001	15.11.04	13:00	4,0	0,6	< 0,1
001	15.11.04	17:00	8,0	16,6	2,1
001	16.11.04	09:00	24,0	13,4	1,8
002	27.10.04	08:30	0,0	< NWG	-
002	27.10.04	10:00	1,0	< NWG	-
002	27.10.04	11:00	2,0	1,1	< 0,1
002	27.10.04	13:00	4,0	174,1	12,5
002	27.10.04	17:00	8,0	432,3	14,7
002	28.10.04	09:00	24,0	58,8	0,4
004	27.10.04	08:30	0,0	< NWG	-
004	27.10.04	10:00	1,0	< NWG	-
004	27.10.04	11:00	2,0	< NWG	-
004	27.10.04	13:00	4,0	10,3	0,5
004	27.10.04	17:00	8,0	21,7	2,1
004	28.10.04	09:00	24,0	5,4	0,1
004	28.10.04	09:00	48,0	4,6	0,2
005/01	27.10.04	08:30	0,0	< NWG	-
005/01	27.10.04	13:00	4,0	0,3	< 0,1
005/01	27.10.04	17:00	8,0	11,1	1,7
005/01	28.10.04	09:00	24,0	8,6	0,2
005/02	Keine Proben				
007	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
007	15.11.04	13:00	4,0	4,7	0,3
007	15.11.04	17:00	8,0	4,9	0,4
007	16.11.04	09:00	24,0	7,1	0,2

Tabelle 10-6: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (ng/m^3)	SD
008	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
008	15.11.04	13:00	4,0	< NWG	-
008	15.11.04	17:00	8,0	61,9	3,7
008	16.11.04	09:00	24,0	40,1	4,0
016	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
016	15.11.04	13:00	4,0	2,6	0,2
016	15.11.04	17:00	8,0	7,5	0,3
016	16.11.04	09:00	24,0	136,1	8,2
101	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
101	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
101	30.05.06	11:00	2,0	< NWG	-
101	30.05.06	13:00	4,0	4,4	0,8
101	30.05.06	17:00	8,0	24,9	0,8
101	31.05.06	09:00	24,0	20,5	1,2
101	01.06.06	09:00	48,0	7,7	0,2
102	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
102	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
102	30.05.06	11:00	2,0	2,3	0,1
102	30.05.06	13:00	4,0	3,9	0,7
102	30.05.06	17:00	8,0	46,8	3,9
102	31.05.06	09:00	24,0	21,9	0,6
102	01.06.06	09:00	48,0	14,6	1,1
103	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
103	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
103	30.05.06	11:00	2,0	1,2	0,1
103	30.05.06	13:00	4,0	2,7	0,5
103	30.05.06	17:00	8,0	2,1	0,2
103	31.05.06	09:00	24,0	0,3	< 0,1
103	01.06.06	09:00	48,0	0,9	< 0,1
104	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
104	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
104	30.05.06	11:00	2,0	3,5	0,1
104	30.05.06	13:00	4,0	12,6	1,3
104	30.05.06	17:00	8,0	47,3	5,4
104	31.05.06	09:00	24,0	18,2	1,0
104	01.06.06	09:00	48,0	4,8	0,3
105	12.06.06	08:30	0,0	< NWG	-
105	12.06.06	10:00	1,0	< NWG	-
105	12.06.06	11:00	2,0	< NWG	-
105	12.06.06	13:00	4,0	< NWG	-
105	12.06.06	17:00	8,0	Gerätedefekt	-
105	13.06.06	09:00	24,0	< NWG	-
105	14.06.06	09:00	48,0	0,8	< 0,1
106	12.06.06	08:30	0,0	< NWG	-
106	12.06.06	10:00	1,0	< NWG	-
106	12.06.06	11:00	2,0	< NWG	-
106	12.06.06	13:00	4,0	< NWG	-
106	12.06.06	17:00	8,0	Gerätedefekt	-
106	13.06.06	09:00	24,0	22,8	1,1
106	14.06.06	09:00	48,0	29,3	0,7

Tabelle 10-6: (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Atemluftproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	(CH ₃) ₃ Bi (ng/m ³)	SD
107	12.06.06	08:30	0,0	< NWG	-
107	12.06.06	10:00	1,0	< NWG	-
107	12.06.06	11:00	2,0	< NWG	-
107	12.06.06	13:00	4,0	0,9	0,1
107	12.06.06	17:00	8,0	Gerätedefekt	
107	13.06.06	09:00	24,0	13,4	1,4
107	14.06.06	09:00	48,0	11,6	1,8
109	31.07.06	08:30	0,0	< NWG	-
109	31.07.06	10:00	1,0	< NWG	-
109	31.07.06	11:00	2,0	< NWG	-
109	31.07.06	13:00	4,0	0,8	0,1
109	31.07.06	17:00	8,0	1,0	0,1
109	01.08.06	09:00	24,0	< NWG	-
109	02.08.06	09:00	48,0	0,8	0,2
111	31.07.06	08:30	0,0	< NWG	-
111	31.07.06	10:00	1,0	< NWG	-
111	31.07.06	11:00	2,0	< NWG	-
111	31.07.06	13:00	4,0	2,6	0,3
111	31.07.06	17:00	8,0	54,4	3,3
111	01.08.06	09:00	24,0	4,3	0,4
111	02.08.06	09:00	48,0	3,0	0,1
112	31.07.06	08:30	0,0	< NWG	-
112	31.07.06	10:00	1,0	< NWG	-
112	31.07.06	11:00	2,0	0,4	< 0,1
112	31.07.06	13:00	4,0	1,4	< 0,1
112	31.07.06	17:00	8,0	1,4	0,1
112	01.08.06	09:00	24,0	< NWG	-
112	02.08.06	09:00	48,0	0,6	< 0,1
113	25.09.06	08:30	0,0	< NWG	-
113	25.09.06	10:00	1,0	< NWG	-
113	25.09.06	11:00	2,0	< NWG	-
113	25.09.06	13:00	4,0	3,7	0,1
113	25.09.06	17:00	8,0	41,2	1,4
113	26.09.06	09:00	24,0	458,5	32,9
113	27.09.06	09:00	48,0	102,8	4,0
114	25.09.06	08:30	0,0	< NWG	-
114	25.09.06	10:00	1,0	< NWG	-
114	25.09.06	11:00	2,0	< NWG	-
114	25.09.06	13:00	4,0	< NWG	-
114	25.09.06	17:00	8,0	1,6	0,1
114	26.09.06	09:00	24,0	1,8	0,1
114	27.09.06	09:00	48,0	14,7	0,7
115	25.09.06	08:30	0,0	< NWG	-
115	25.09.06	10:00	1,0	< NWG	-
115	25.09.06	11:00	2,0	< NWG	-
115	25.09.06	13:00	4,0	< NWG	-
115	25.09.06	17:00	8,0	68,3	1,8
115	26.09.06	09:00	24,0	7,8	0,5
115	27.09.06	09:00	48,0	4,8	0,4

Tabelle 11-7: Übersicht des als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ exhalieren Bismuts

ID	Masse exhalieren Bismuts (ng)	‰ von 215 mg Bi
001	138	0,001
002	3410	0,016
004	205	0,001
005/01	90	< 0,001
005/02	-	-
007	62	< 0,001
008	470	0,002
016	587	0,003
101	381	0,002
102	549	0,003
103	24	< 0,001
104	470	0,002
105	6	< 0,001
106	404	0,002
107	205	0,001
109	13	< 0,001
111	337	0,002
112	15	< 0,001
113	5413	0,025
114	114	0,001
115	449	0,002

Tabelle 11-8: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (pg/ml)	SD
001	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
001	15.11.04	09:52	0,5	< NWG	-
001	15.11.04	10:00	1,0	< NWG	-
001	15.11.04	11:00	2,0	< NWG	-
001	15.11.04	13:00	4,0	< NWG	-
001	15.11.04	17:00	8,0	0,05	0,02
001	16.11.04	09:00	24,0	0,06	> 0,01
001	16.11.04	17:00	32,0	< NWG	-
001	17.11.04	09:00	48,0	0,07	0,02
001	17.11.04	17:00	56,0	0,10	> 0,01
002	27.10.04	08:30	0,0	< NWG	-
002	27.10.04	11:00	2,0	0,10	0,01
002	27.10.04	13:00	4,0	0,83	0,02
002	27.10.04	17:00	8,0	1,24	0,04
002	28.10.04	09:00	24,0	0,83	0,03
002	29.10.04	09:00	48,0	< NWG	-
004	27.10.04	08:30	0,0	< NWG	-
004	27.10.04	11:00	2,0	< NWG	-
004	27.10.04	13:00	4,0	0,10	0,01
004	27.10.04	17:00	8,0	0,09	0,01
004	28.10.04	09:00	24,0	< NWG	-
004	29.10.04	09:00	48,0	< NWG	-

Tabelle 10-8: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (pg/ml)	SD
005/01	27.10.04	09:00	0,0	< NWG	-
005/01	27.10.04	09:30	0,5	< NWG	-
005/01	27.10.04	10:00	1,0	< NWG	-
005/01	27.10.04	11:00	2,0	< NWG	-
005/01	27.10.04	13:00	4,0	< NWG	-
005/01	27.10.04	17:00	8,0	< NWG	-
005/01	28.10.04	09:00	24,0	< NWG	-
005/01	28.10.04	17:00	32,0	< NWG	-
005/01	29.10.04	09:00	48,0	< NWG	-
005/01	29.10.04	17:00	56,0	< NWG	-
005/02	28.02.06	09:00	0,0	< NWG	-
005/02	28.02.06	09:30	0,5	< NWG	-
005/02	28.02.06	10:00	1,0	< NWG	-
005/02	28.02.06	11:00	2,0	< NWG	-
005/02	28.02.06	13:00	4,0	< NWG	-
005/02	28.02.06	17:00	8,0	< NWG	-
005/02	01.03.06	09:00	24,0	0,06	0,01
005/02	01.03.06	17:00	32,0	< NWG	-
005/02	02.03.06	09:00	48,0	< NWG	-
005/02	02.03.06	17:00	56,0	< NWG	-
007	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
007	15.11.04	09:30	0,5	< NWG	-
007	15.11.04	10:00	1,0	< NWG	-
007	15.11.04	11:00	2,0	< NWG	-
007	15.11.04	13:00	4,0	< NWG	-
007	15.11.04	17:00	8,0	< NWG	-
007	16.11.04	09:00	24,0	< NWG	-
007	16.11.04	17:00	32,0	< NWG	-
007	17.11.04	09:00	48,0	< NWG	-
007	17.11.04	17:00	56,0	< NWG	-
008	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
008	15.11.04	09:30	0,5	< NWG	-
008	15.11.04	10:00	1,0	< NWG	-
008	15.11.04	11:00	2,0	< NWG	-
008	15.11.04	13:00	4,0	< NWG	-
008	15.11.04	17:00	8,0	0,15	0,01
008	16.11.04	09:00	24,0	0,07	0,01
008	16.11.04	17:00	32,0	0,05	0,01
008	17.11.04	09:00	48,0	0,04	0,01
008	17.11.04	17:00	56,0	< NWG	-
016	15.11.04	08:30	0,0	< NWG	-
016	15.11.04	09:30	0,5	< NWG	-
016	15.11.04	10:00	1,0	< NWG	-
016	15.11.04	11:00	2,0	< NWG	-
016	15.11.04	13:00	4,0	< NWG	-
016	15.11.04	17:00	8,0	< NWG	-
016	16.11.04	09:00	24,0	0,35	0,05
016	16.11.04	17:00	32,0	0,14	0,01
016	17.11.04	09:00	48,0	0,24	0,04
016	17.11.04	17:00	56,0	0,18	0,02

Tabelle 10-8: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (pg/ml)	SD
101	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
101	30.05.06	09:30	0,5	< NWG	-
101	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
101	30.05.06	11:00	2,0	< NWG	-
101	30.05.06	13:00	4,0	< NWG	-
101	30.05.06	17:00	8,0	0,10	0,02
101	31.05.06	09:00	24,0	0,04	0,01
101	31.05.06	17:00	32,0	0,05	0,01
101	01.06.06	09:00	48,0	0,04	> 0,01
101	01.06.06	17:00	56,0	0,05	0,02
102	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
102	30.05.06	09:30	0,5	< NWG	-
102	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
102	30.05.06	11:00	2,0	< NWG	-
102	30.05.06	13:00	4,0	< NWG	-
102	30.05.06	17:00	8,0	0,22	0,01
102	31.05.06	09:00	24,0	< NWG	-
102	31.05.06	17:00	32,0	0,05	> 0,01
102	01.06.06	09:00	48,0	0,04	> 0,01
102	01.06.06	17:00	56,0	< NWG	-
103	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
103	30.05.06	09:30	0,5	< NWG	-
103	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
103	30.05.06	11:00	2,0	< NWG	-
103	30.05.06	13:00	4,0	< NWG	-
103	30.05.06	17:00	8,0	< NWG	-
103	31.05.06	09:00	24,0	< NWG	-
103	31.05.06	17:00	32,0	< NWG	-
103	01.06.06	09:00	48,0	< NWG	-
103	01.06.06	17:00	56,0	< NWG	-
104	30.05.06	08:30	0,0	< NWG	-
104	30.05.06	09:30	0,5	< NWG	-
104	30.05.06	10:00	1,0	< NWG	-
104	30.05.06	11:00	2,0	< NWG	-
104	30.05.06	13:00	4,0	0,04	0,01
104	30.05.06	17:00	8,0	0,14	0,02
104	31.05.06	09:00	24,0	0,06	0,01
104	31.05.06	17:00	32,0	0,04	> 0,01
104	01.06.06	09:00	48,0	< NWG	-
104	01.06.06	17:00	56,0	< NWG	-
105	12.06.06	08:30	0,0	< NWG	-
105	12.06.06	09:30	0,5	< NWG	-
105	12.06.06	10:00	1,0	< NWG	-
105	12.06.06	11:00	2,0	< NWG	-
105	12.06.06	12:45	4,0	< NWG	-
105	12.06.06	17:00	8,0	< NWG	-
105	13.06.06	09:00	24,0	< NWG	-
105	13.06.06	17:00	32,0	< NWG	-
105	14.06.06	09:00	48,0	< NWG	-
105	14.06.06	17:00	56,0	< NWG	-

Tabelle 10-8: (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	(CH ₃) ₃ Bi (pg/ml)	SD
106	12.06.06	08:30	0,0	< NWG	-
106	12.06.06	09:30	0,5	< NWG	-
106	12.06.06	10:00	1,0	< NWG	-
106	12.06.06	11:00	2,0	< NWG	-
106	12.06.06	13:00	4,0	< NWG	-
106	12.06.06	17:00	8,0	< NWG	-
106	13.06.06	09:00	24,0	0,87	0,04
106	13.06.06	17:00	32,0	0,04	0,01
106	14.06.06	09:00	48,0	0,05	0,01
106	14.06.06	17:00	56,0	0,08	0,01
107	12.06.06	08:30	0,0	< NWG	-
107	12.06.06	09:30	0,5	< NWG	-
107	12.06.06	10:00	1,0	< NWG	-
107	12.06.06	11:00	2,0	< NWG	-
107	12.06.06	13:00	4,0	< NWG	-
107	12.06.06	17:00	8,0	0,08	0,01
107	13.06.06	09:00	24,0	0,05	0,02
107	13.06.06	17:00	32,0	0,04	> 0,01
107	14.06.06	09:00	48,0	0,04	0,1
107	14.06.06	17:00	56,0	< NWG	-
109	31.07.06	08:30	0,0	< NWG	-
109	31.07.06	09:30	0,5	< NWG	-
109	31.07.06	10:00	1,0	< NWG	-
109	31.07.06	11:00	2,0	< NWG	-
109	31.07.06	13:00	4,0	< NWG	-
109	31.07.06	17:00	8,0	< NWG	-
109	01.08.06	09:00	24,0	< NWG	-
109	01.08.06	17:00	32,0	< NWG	-
109	01.08.06	09:00	48,0	< NWG	-
109	01.08.06	17:00	56,0	< NWG	-
111	31.07.06	08:30	0,0	< NWG	-
111	31.07.06	09:30	0,5	< NWG	-
111	31.07.06	10:00	1,0	< NWG	-
111	31.07.06	11:00	2,0	< NWG	-
111	31.07.06	13:00	4,0	< NWG	-
111	31.07.06	17:00	8,0	0,2	0,08
111	01.08.06	09:00	24,0	< NWG	-
111	01.08.06	17:00	32,0	< NWG	-
111	01.08.06	09:00	48,0	< NWG	-
111	01.08.06	17:00	56,0	< NWG	-
112	31.07.06	08:30	0,0	< NWG	-
112	31.07.06	09:30	0,5	< NWG	-
112	31.07.06	10:00	1,0	< NWG	-
112	31.07.06	11:00	2,0	< NWG	-
112	31.07.06	13:00	4,0	< NWG	-
112	31.07.06	17:00	8,0	< NWG	-
112	01.08.06	09:00	24,0	< NWG	-
112	01.08.06	17:00	32,0	< NWG	-
112	01.08.06	09:00	48,0	< NWG	-
112	01.08.06	17:00	56,0	< NWG	-

Tabelle 10-8: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (pg/ml)	SD
113	25.09.06	08:30	0,0	< NWG	-
113	25.09.06	09:30	0,5	< NWG	-
113	25.09.06	10:00	1,0	< NWG	-
113	25.09.06	11:00	2,0	< NWG	-
113	25.09.06	13:00	4,0	< NWG	-
113	25.09.06	17:00	8,0	0,11	0,06
113	26.09.06	09:00	24,0	2,47	0,20
113	26.09.06	17:00	32,0	0,92	0,08
113	27.09.06	09:00	48,0	0,34	0,01
113	27.09.06	17:00	56,0	0,16	0,04
114	25.09.06	08:30	0,0	< NWG	-
114	25.09.06	09:30	0,5	< NWG	-
114	25.09.06	10:00	1,0	< NWG	-
114	25.09.06	11:00	2,0	< NWG	-
114	25.09.06	13:00	4,0	< NWG	-
114	25.09.06	17:00	8,0	< NWG	-
114	26.09.06	09:00	24,0	< NWG	-
114	26.09.06	17:00	32,0	< NWG	-
114	27.09.06	09:00	48,0	< NWG	-
114	27.09.06	17:00	56,0	< NWG	-
115	25.09.06	08:30	0,0	< NWG	-
115	25.09.06	09:30	0,5	< NWG	-
115	25.09.06	10:00	1,0	< NWG	-
115	25.09.06	11:00	2,0	< NWG	-
115	25.09.06	13:00	4,0	< NWG	-
115	25.09.06	17:00	8,0	0,24	0,03
115	26.09.06	09:00	24,0	< NWG	-
115	26.09.06	17:00	32,0	< NWG	-
115	27.09.06	09:00	48,0	< NWG	-
115	27.09.06	17:00	56,0	< NWG	-

11.5 Messergebnisse der kinetischen Untersuchung eines Probanden

Tabelle 11-9: Bismut-Konzentrationen in Blutproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
116	15.01.07	09:00	0,0	0,1	< 0,1
116	15.01.07	09:15	0,2	0,7	< 0,1
116	15.01.07	09:20	0,3	1,6	< 0,1
116	15.01.07	09:30	0,5	2,1	0,1
116	15.01.07	09:40	0,7	2,2	0,1
116	15.01.07	10:00	1,0	1,6	< 0,1
116	15.01.07	10:10	1,2	1,5	< 0,1
116	15.01.07	10:20	1,3	1,5	< 0,1
116	15.01.07	10:30	1,5	1,4	< 0,1
116	15.01.07	10:40	1,7	1,5	< 0,1
116	15.01.07	10:50	1,8	1,3	< 0,1
116	15.01.07	11:00	2,0	1,1	< 0,1
116	15.01.07	11:10	2,2	1,1	< 0,1
116	15.01.07	11:20	2,3	1,4	< 0,1

Tabelle 10-9: Bismut-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
116	15.01.07	11:30	2,5	1,1	< 0,1
116	15.01.07	11:40	2,7	1,0	< 0,1
116	15.01.07	11:50	2,8	1,0	< 0,1
116	15.01.07	12:00	3,0	0,9	< 0,1
116	15.01.07	13:00	4,0	0,6	< 0,1
116	15.01.07	14:00	5,0	0,6	< 0,1
116	15.01.07	15:00	6,0	0,4	< 0,1
116	15.01.07	16:00	7,0	0,3	< 0,1
116	15.01.07	17:00	8,0	0,4	< 0,1
116	15.01.07	18:00	9,0	0,4	< 0,1
116	15.01.07	19:00	10,0	0,4	< 0,1
116	15.01.07	20:00	11,0	0,4	< 0,1
116	16.01.07	08:00	23,0	0,3	< 0,1
116	16.01.07	11:00	26,0	0,1	< 0,1
116	16.01.07	12:00	27,0	0,3	< 0,1
116	16.01.07	13:30	28,5	0,3	< 0,1
116	17.01.07	08:24	47,4	0,2	< 0,1
116	17.01.07	10:29	49,5	0,2	< 0,1
116	17.01.07	12:25	51,4	0,2	< 0,1
116	18.01.07	08:20	71,3	0,4	< 0,1
116	18.01.07	10:31	73,5	0,4	< 0,1
116	18.01.07	13:20	76,3	0,3	< 0,1
116	26.11.07	09:00	0,0	0,1	< 0,1
116	26.11.07	09:11	0,2	2,3	0,1
116	26.11.07	09:20	0,3	5,0	0,2
116	26.11.07	09:30	0,5	4,9	0,1
116	26.11.07	09:52	0,9	4,4	0,1
116	26.11.07	10:00	1,0	4,2	0,1
116	26.11.07	10:15	1,3	3,8	0,1
116	26.11.07	10:30	1,5	4,2	0,1
116	26.11.07	10:39	1,6	3,8	0,1
116	26.11.07	10:50	1,8	3,9	0,1
116	26.11.07	11:00	2,0	3,7	0,1
116	26.11.07	11:12	2,2	3,3	0,1
116	26.11.07	11:21	2,3	3,3	0,1
116	26.11.07	11:30	2,5	6,9	0,2
116	26.11.07	11:40	2,7	3,4	0,1
116	26.11.07	12:00	3,0	3,0	0,1
116	26.11.07	13:00	4,0	2,6	0,1
116	26.11.07	15:00	6,0	1,6	< 0,1
116	26.11.07	17:00	8,0	1,0	< 0,1
116	27.11.07	08:07	23,1	0,7	< 0,1
116	27.11.07	11:11	26,2	0,6	< 0,1
116	27.11.07	15:07	30,1	1,4	< 0,1
116	28.11.07	08:07	47,1	0,4	< 0,1
116	28.11.07	13:14	52,2	0,8	< 0,1
116	28.11.07	18:10	57,2	0,5	< 0,1
116	29.11.07	10:18	73,3	0,5	< 0,1
116	29.11.07	15:11	78,2	0,5	< 0,1
116	29.11.07	17:20	80,3	0,5	< 0,1

Tabelle 10-9: Bismut-Konzentrationen in Blutproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (µg/l)	SD
116	30.11.07	09:40	96,7	1,6	< 0,1
116	30.11.07	13:51	100,8	0,8	< 0,1
116	30.11.07	17:00	104,0	0,6	< 0,1

Tabelle 11-10: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
116	15.01.07	09:00	0,0	-	252,6	< NWG	-	-
116	15.01.07	09:54	0,9	650	52,0	15,7	0,5	0,0000302
116	15.01.07	10:43	1,7	650	11,3	9,9	0,3	0,0000876
116	15.01.07	12:06	3,1	670	15,8	16,4	0,5	0,0001038
116	15.01.07	15:40	6,7	350	77,9	39,0	1,2	0,0000501
116	15.01.07	18:35	9,6	600	39,1	13,9	0,4	0,0000355
116	15.01.07	20:42	11,7	400	40,1	11,1	0,3	0,0000277
116	15.01.07	21:43	12,7	450	13,0	2,0	0,1	0,0000154
116	15.01.07	23:07	14,1	450	22,7	4,4	0,1	0,0000194
116	16.01.07	00:48	15,8	350	30,0	7,1	0,2	0,0000237
116	16.01.07	06:15	21,2	400	78,6	19,2	0,6	0,0000244
116	16.01.07	09:55	24,9	400	67,2	12,4	0,4	0,0000185
116	16.01.07	11:45	26,8	400	33,9	5,6	0,2	0,0000165
116	16.01.07	14:30	29,5	400	77,0	8,2	0,2	0,0000106
116	16.01.07	15:26	30,4	525	22,7	0,7	< 0,1	0,0000031
116	16.01.07	16:15	31,3	600	15,6	0,3	< 0,1	0,0000019
116	16.01.07	18:00	33,0	500	31,7	1,8	0,1	0,0000057
116	16.01.07	19:30	34,5	200	83,3	7,5	0,2	0,0000090
116	16.01.07	20:22	35,4	550	15,2	0,6	< 0,1	0,0000039
116	16.01.07	21:13	36,2	650	11,9	< NWG	-	-
116	16.01.07	22:26	37,4	250	40,5	4,0	0,1	0,0000099
116	17.01.07	03:53	42,9	250	210,5	17,9	0,5	0,0000085
116	17.01.07	10:35	49,6	600	96,6	7,6	0,2	0,0000079
116	17.01.07	12:30	51,5	350	49,1	4,4	0,1	0,0000090
116	17.01.07	15:15	54,2	475	46,1	2,7	0,1	0,0000059
116	17.01.07	16:38	55,6	300	48,1	2,2	0,1	0,0000046
116	17.01.07	18:03	57,0	475	24,0	0,7	< 0,1	0,0000029
116	17.01.07	18:45	57,8	500	12,0	< NWG	-	-
116	17.01.07	19:30	58,5	400	12,9	< NWG	-	-
116	17.01.07	22:00	61,0	400	50,0	0,5	< 0,1	0,0000010
116	17.01.07	22:50	61,8	350	18,0	0,3	< 0,1	0,0000017
116	18.01.07	06:15	69,2	475	103,9	5,9	0,2	0,0000057
116	18.01.07	10:43	73,7	550	59,5	2,6	0,1	0,0000044
116	18.01.07	11:37	74,6	275	25,9	0,4	< 0,1	0,0000015
116	18.01.07	12:55	75,9	225	39,1	1,0	< 0,1	0,0000026
116	18.01.07	14:45	77,8	500	36,2	< NWG	-	-
116	18.01.07	16:15	79,3	100	86,8	2,7	0,1	0,0000031
116	18.01.07	19:00	82,0	400	50,7	1,0	< 0,1	0,0000020
116	18.01.07	20:49	83,8	250	55,2	1,1	< 0,1	0,0000020
116	18.01.07	21:25	84,4	300	26,4	0,1	< 0,1	0,0000004
116	19.01.07	07:46	94,8	450	163,2	5,8	0,2	0,0000036

Tabelle 10-10: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
116	14.08.07	09:00	0,0	-	51,2	< NWG	-	-
116	14.08.07	09:45	0,8	600	10,1	1,2	< 0,1	0,0000119
116	14.08.07	13:10	4,2	600	41,8	18,9	0,6	0,0000452
116	14.08.07	14:10	5,2	600	12,8	3,4	0,1	0,0000266
116	14.08.07	15:50	6,8	650	13,7	2,2	0,1	0,0000161
116	14.08.07	17:00	8,0	500	16,1	1,5	< 0,1	0,0000093
116	14.08.07	18:35	9,6	500	22,2	2,7	0,1	0,0000122
116	14.08.07	19:55	10,9	600	13,8	1,5	0,0	0,0000109
116	14.08.07	22:05	13,1	650	22,2	2,9	0,1	0,0000131
116	15.08.07	00:00	15,0	325	166,2	17,7	0,5	0,0000106
116	15.08.07	11:45	26,0	250	153,6	12,4	0,4	0,0000081
116	15.08.07	17:45	32,0	600	83,4	4,0	0,1	0,0000048
116	15.08.07	18:55	33,2	250	43,3	1,3	< 0,1	0,0000030
116	15.08.07	20:40	34,9	650	21,1	< NWG	-	-
116	16.08.07	00:20	38,6	350	70,1	2,7	0,1	0,0000039
116	16.08.07	11:45	50,0	550	154,4	5,7	0,2	0,0000037
116	16.08.07	14:30	52,7	500	42,8	0,7	< 0,1	0,0000016
116	16.08.07	16:25	54,7	500	30,9	0,1	< 0,1	0,0000003
116	16.08.07	19:20	57,6	425	49,6	0,6	< 0,1	0,0000012
116	16.08.07	21:35	59,8	500	33,2	< NWG	-	-
116	17.08.07	00:45	63,0	350	59,3	0,6	< 0,1	0,0000010
116	17.08.07	12:15	74,5	500	83,1	1,1	< 0,1	0,0000013
116	17.08.07	16:05	78,3	450	35,1	< NWG	-	-
116	17.08.07	17:15	79,5	400	29,3	< NWG	-	-
116	17.08.07	20:00	82,3	475	37,7	< NWG	-	-
116	18.08.07	00:00	87,0	550	190,8	0,7	< 0,1	0,0000004
116	18.08.07	20:05	102,9	450	96,9	0,4	< 0,1	0,0000004
116	18.08.07	23:00	105,8	400	86,1	0,2	< 0,1	0,0000002
116	19.08.07	00:00	110,3	650	92,8	0,4	< 0,1	0,0000004
116	19.08.07	12:15	118,1	600	48,8	< NWG	-	-
116	26.11.07	09:00	0,0	-	160,1	< NWG	-	-
116	26.11.07	11:15	2,3	750	49,1	128,3	3,8	0,0002613
116	26.11.07	15:43	6,7	350	28,3	310,6	9,3	0,0010975
116	26.11.07	18:40	9,7	400	53,8	58,9	1,8	0,0001095
116	26.11.07	22:20	13,3	450	60,3	57,3	1,7	0,0000950
116	27.11.07	00:00	15,0	500	20,9	83,0	2,5	0,0003971
116	27.11.07	12:30	27,5	410	185,3	55,9	1,7	0,0000302
116	27.11.07	17:35	32,6	500	30,7	30,2	0,9	0,0000984
116	27.11.07	21:00	36,0	450	61,5	21,2	0,6	0,0000345
116	28.11.07	07:00	46,0	800	42,1	23,6	0,7	0,0000561
116	28.11.07	11:00	50,0	450	53,2	15,4	0,5	0,0000289
116	28.11.07	13:05	52,1	450	29,8	9,7	0,3	0,0000326
116	28.11.07	19:00	58,0	450	14,7	12,9	0,4	0,0000878
116	29.11.07	00:45	63,8	800	71,6	14,1	0,4	0,0000197
116	29.11.07	08:30	71,5	400	171,4	19,2	0,6	0,0000112
116	29.11.07	13:50	76,8	400	46,2	26,3	0,8	0,0000569
116	29.11.07	17:30	80,5	550	51,5	9,2	0,3	0,0000179
116	29.11.07	19:00	82,0	500	24,5	3,2	0,1	0,0000131
116	29.11.07	20:20	83,3	350	37,8	3,2	0,1	0,0000085

Tabelle 10-10: Bismut- und Kreatinin-Konzentrationen in Urinproben (Fortsetzung)

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Volumen (ml)	Kreatinin (mg/dl)	Bismut (µg/l)	SD	Bismut/ Kreatinin
116	30.11.07	04:30	91,5	850	142,5	4,5	0,1	0,0000032
116	30.11.07	11:15	98,3	400	101,4	9,2	0,3	0,0000091
116	30.11.07	14:06	101,1	400	44,9	6,7	0,2	0,0000149
116	30.11.07	15:10	102,2	100	23,1	7,6	0,2	0,0000329
116	30.11.07	18:20	105,3	300	17,9	7,6	0,2	0,0000425

Tabelle 11-11: Zeiträume und Massen des renal eliminierten Bismuts

ID	116 (215 mg Bi I)	116 (215 mg Bi II)	116 (430 mg Bi)
0-12 h (µg)	54	19	228
12,1-24 h (µg)	13	8	67
24,1-36 h (µg)	14	6	48
36,1-48 h (µg)	6	1	19
48,1-60 h (µg)	8	4	17
61,1-72 h (µg)	3	< 1	19
72,1-84 h (µg)	3	1	18
84,1-96 h (µg)	3	< 1	4
96,1-108 h (µg)	-	< 1	9
108,1-120 h (µg)	-	< 1	-
Σ (µg)	103	38	430
% 0-12 h	52	50	53
% absorbiert	0,05	0,02	0,1

Tabelle 11-12: Bismut-Konzentrationen in Fäzesproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Bismut (mg/g)	SD	Fäzesmasse gesamt (g)	Gesamtmasse Bismut (mg)
116	14.01.07	Vorprobe	0,0	< NWG	-	-	-
116	16.01.07	14:30	29,5	0,43	0,03	38,37	16,5
116	16.01.07	19:30	34,5	0,99	0,07	71,85	71,1
116	17.01.07	15:45	54,8	0,51	0,04	211,60	107,9
116	18.01.07	16:15	79,3	0,01	< 0,01	223,06	2,2
116	20.01.07	12:15	123,3	< NWG	-	100,20	-
116	14.08.07	Vorprobe	0,0	< NWG	-	-	-
116	15.08.07	11:45	26,8	0,34	0,02	128,20	43,6
116	15.08.07	18:55	33,9	0,66	0,05	160,08	105,7
116	16.08.07	15:10	54,2	0,18	0,01	216,20	38,9
116	17.08.07	12:15	75,3	0,01	< 0,01	201,22	2,0
116	18.08.07	15:10	102,2	0,09	0,01	99,50	9,0
116	25.11.07	Vorprobe	0,0	0,01	< 0,01	-	-
116	27.11.07	14:00	29,0	0,02	< 0,01	220,60	4,4
116	28.11.07	15:55	54,9	2,13	0,15	85,77	182,7
116	29.11.07	20:20	81,3	1,69	0,12	94,85	160,3
116	30.11.07	15:10	100,2	0,27	0,02	108,83	29,4
116	01.12.07	10:00	121,0	0,14	0,01	106,60	14,9

Tabelle 11-13: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (ng/m ³)	SD
116	15.01.07	14:06	5,1	1,9	-
116	15.01.07	15:06	6,1	1,4	-
116	15.01.07	15:35	6,6	1,1	-
116	15.01.07	16:00	7,0	0,5	-
116	15.01.07	17:00	8,0	0,7	-
116	15.01.07	17:40	8,7	0,7	-
116	15.01.07	18:10	9,2	0,8	-
116	15.01.07	18:30	9,5	2,8	-
116	15.01.07	18:53	9,9	0,7	-
116	15.01.07	19:10	10,2	1,2	-
116	15.01.07	19:33	10,6	0,9	-
116	15.01.07	19:51	10,9	1,0	-
116	15.01.07	20:25	11,4	1,1	-
116	15.01.07	20:53	11,9	0,9	-
116	15.01.07	21:21	12,4	0,9	-
116	15.01.07	23:03	14,1	1,0	-
116	16.01.07	08:05	23,1	0,5	-
116	16.01.07	08:43	23,7	0,6	-
116	16.01.07	14:30	29,5	0,9	-
116	16.01.07	15:08	30,1	1,0	-
116	16.01.07	15:41	30,7	1,2	-
116	16.01.07	16:15	31,3	1,4	-
116	16.01.07	16:35	31,6	1,5	-
116	16.01.07	17:03	32,1	1,3	-
116	16.01.07	17:30	32,5	1,8	-
116	16.01.07	18:35	33,6	3,0	-
116	17.01.07	15:12	54,2	3,3	-
116	17.01.07	15:45	54,8	4,0	-
116	17.01.07	16:15	55,3	2,6	-
116	17.01.07	16:45	55,8	1,9	-
116	17.01.07	17:15	56,3	1,6	-
116	17.01.07	17:45	56,8	1,6	-
116	17.01.07	18:15	57,3	2,3	-
116	17.01.07	18:50	57,8	3,6	-
116	17.01.07	20:05	59,1	2,7	-
116	17.01.07	20:40	59,7	2,7	-
116	19.01.07	17:50	104,8	1,0	-
116	19.01.07	18:05	105,1	1,0	-
116	19.01.07	18:20	105,3	0,8	-
116	14.08.07	09:00	0,0	< NWG	-
116	14.08.07	11:05	2,1	2,4	0,1
116	14.08.07	11:41	2,7	3,9	0,6
116	14.08.07	12:17	3,3	2,6	0,4
116	14.08.07	13:11	4,2	1,3	0,1
116	14.08.07	15:00	6,0	1,4	0,1
116	14.08.07	16:00	7,0	1,3	0,1
116	14.08.07	17:02	8,0	1,1	0,1
116	14.08.07	18:10	9,2	1,1	< 0,1
116	14.08.07	19:10	10,2	1,2	0,1
116	14.08.07	20:30	11,5	1,2	0,1
116	14.08.07	23:10	14,2	0,9	0,1

Tabelle 10-13: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (ng/m ³)	SD
116	15.08.07	09:05	24,1	0,8	0,1
116	15.08.07	12:06	27,1	1,0	0,1
116	15.08.07	15:27	30,5	1,0	0,1
116	15.08.07	18:15	33,3	1,2	0,1
116	15.08.07	21:00	36,0	0,8	0,1
116	15.08.07	23:11	38,2	0,9	0,1
116	16.08.07	09:00	48,0	2,5	0,2
116	16.08.07	10:01	49,0	1,3	0,1
116	16.08.07	10:58	50,0	2,9	0,5
116	16.08.07	12:33	51,6	4,9	0,2
116	16.08.07	14:33	53,6	2,3	0,1
116	16.08.07	20:01	59,0	0,7	< 0,1
116	16.08.07	22:00	61,0	0,8	0,1
116	17.08.07	00:00	63,0	1,2	0,1
116	17.08.07	09:00	72,0	1,7	0,1
116	17.08.07	10:35	73,6	0,8	< 0,1
116	17.08.07	12:30	75,5	0,8	< 0,1
116	17.08.07	16:01	79,0	< NWG	-
116	17.08.07	18:35	81,6	< NWG	-
116	17.08.07	22:00	85,0	0,5	0,1
116	18.08.07	13:00	100,0	0,4	< 0,1
116	18.08.07	14:34	101,6	0,4	< 0,1
116	18.08.07	16:00	103,0	0,4	< 0,1
116	19.08.07	10:08	121,1	0,5	0,1
116	24.11.07	09:00	0,0	< NWG	-
116	24.11.07	09:57	1,0	< NWG	-
116	24.11.07	11:03	2,1	< NWG	-
116	24.11.07	12:08	3,1	< NWG	-
116	24.11.07	13:05	4,1	0,8	0,1
116	24.11.07	13:48	4,8	2,7	0,2
116	24.11.07	15:03	6,1	4,2	0,2
116	24.11.07	16:15	7,3	2,4	< 0,1
116	24.11.07	16:45	7,8	3,9	0,5
116	24.11.07	18:25	9,4	7,0	< 0,1
116	24.11.07	19:25	10,4	4,2	< 0,1
116	24.11.07	20:17	11,3	2,4	0,4
116	24.11.07	21:37	12,6	1,7	-
116	25.11.07	09:07	24,1	0,6	0,1
116	25.11.07	10:07	25,1	1,0	0,1
116	25.11.07	12:15	27,3	0,7	0,2
116	25.11.07	13:28	28,5	0,7	0,1
116	25.11.07	14:15	29,3	0,6	0,1
116	25.11.07	16:03	31,1	0,6	< 0,1
116	25.11.07	17:03	32,1	0,5	< 0,1
116	25.11.07	18:12	33,2	0,6	0,1

Tabelle 10-13: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Atemluftproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (ng/m ³)	SD
116	26.11.07	09:08	48,1	3,8	0,2
116	26.11.07	10:15	49,3	2,3	0,9
116	26.11.07	12:00	51,0	9,0	0,8
116	26.11.07	12:25	51,4	5,9	0,3
116	26.11.07	14:17	53,3	5,0	0,1
116	26.11.07	15:51	54,9	5,7	0,6
116	26.11.07	17:10	56,2	3,5	0,2
116	27.11.07	09:12	72,2	< NWG	-
116	27.11.07	11:14	74,2	< NWG	-
116	27.11.07	12:45	75,8	< NWG	-
116	27.11.07	13:55	76,9	< NWG	-
116	27.11.07	16:00	79,0	< NWG	-
116	27.11.07	19:05	82,1	< NWG	-
116	28.11.07	08:44	95,7	2,8	0,5
116	28.11.07	11:03	98,1	1,2	0,1
116	28.11.07	12:24	99,4	4,4	0,5
116	28.11.07	14:45	101,8	2,2	0,1
116	28.11.07	16:15	103,3	1,6	0,1
116	28.11.07	17:44	104,7	1,1	0,1

Tabelle 11-14: Übersicht des als $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ exhalieren Bismuts

ID	Bismut-Dosis (mg)	Masse exhalieren Bismuts (ng)	ppm der Bismut-Dosis
116	215	98	0,46
116	215	61	0,29
116	430	97	0,22

Tabelle 11-15: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Blutproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (pg/ml)	SD
116	15.01.07	09:00	0,0	< NWG	-
116	15.01.07	11:00	2,0	< NWG	-
116	15.01.07	14:00	5,0	< NWG	-
116	15.01.07	15:00	6,0	< NWG	-
116	15.01.07	15:30	6,5	< NWG	-
116	15.01.07	16:00	7,0	< NWG	-
116	15.01.07	16:30	7,5	< NWG	-
116	15.01.07	17:00	8,0	< NWG	-
116	15.01.07	17:30	8,5	< NWG	-
116	15.01.07	18:30	9,5	< NWG	-
116	15.01.07	19:00	10,0	< NWG	-
116	15.01.07	19:30	10,5	< NWG	-
116	15.01.07	20:00	11,0	< NWG	-

Tabelle 10-15: (CH₃)₃Bi-Konzentrationen in Blutproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	(CH ₃) ₃ Bi (pg/ml)	SD
116	16.01.07	08:00	23,0	< NWG	-
116	16.01.07	09:00	24,0	< NWG	-
116	16.01.07	11:00	26,0	< NWG	-
116	16.01.07	12:00	27,0	< NWG	-
116	16.01.07	13:00	28,0	< NWG	-
116	16.01.07	13:30	28,5	< BG	-
116	17.01.07	08:24	47,4	< BG	-
116	17.01.07	10:29	49,5	< BG	-
116	17.01.07	11:23	50,4	< BG	-
116	17.01.07	12:25	51,4	< BG	-
116	17.01.07	13:00	52,0	< BG	-
116	18.01.07	08:20	71,3	< BG	-
116	18.01.07	09:24	72,4	< BG	-
116	18.01.07	10:31	73,5	< BG	-
116	18.01.07	11:35	74,6	< BG	-
116	18.01.07	13:20	76,3	< BG	-
116	23.11.07	Vorprobe	0,0	< NWG	-
116	24.11.07	09:00	0,0	< NWG	-
116	24.11.07	10:00	1,0	< NWG	-
116	24.11.07	10:30	1,5	< NWG	-
116	24.11.07	11:00	2,0	< NWG	-
116	24.11.07	12:00	3,0	< NWG	-
116	24.11.07	13:00	4,0	< NWG	-
116	24.11.07	14:00	5,0	< BG	-
116	24.11.07	15:00	6,0	< BG	-
116	24.11.07	15:30	6,5	< BG	-
116	24.11.07	15:58	7,0	< BG	-
116	24.11.07	16:30	7,5	< BG	-
116	24.11.07	17:00	8,0	< BG	-
116	24.11.07	17:30	8,5	< BG	-
116	25.11.07	08:07	23,1	< NWG	-
116	25.11.07	11:11	26,2	< NWG	-
116	25.11.07	15:07	30,1	< NWG	-
116	26.11.07	08:07	47,1	< BG	-
116	26.11.07	13:14	52,2	0,04	< 0,01
116	26.11.07	18:10	57,2	0,04	< 0,01
116	27.11.07	10:18	73,3	< NWG	-
116	27.11.07	15:11	78,2	< BG	-
116	27.11.07	17:20	80,3	< BG	-
116	28.11.07	09:40	96,7	< NWG	-
116	28.11.07	13:51	100,9	< BG	-
116	28.11.07	17:00	104,0	< NWG	-

Tabelle 11-16: $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ -Konzentrationen in Fäzesproben

ID	Datum	Uhrzeit	Zeit (h)	Masse (g)	$(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (ng/kg)	SD
116	14.01.07	Vorprobe	0,0	-	< NWG	-
116	16.01.07	14:30	29,5	38,37	99	9
116	16.01.07	19:30	34,5	71,85	106	10
116	17.01.07	15:45	54,8	211,60	577	52
116	18.01.07	16:15	79,3	223,06	1738	156
116	20.01.07	12:15	123,3	100,20	41	4
116	14.08.07	Vorprobe	0,0	-	< NWG	-
116	15.08.07	11:45	26,8	128,20	333	30
116	15.08.07	18:55	33,9	160,08	611	55
116	16.08.07	15:10	54,2	216,20	3115	280
116	17.08.07	12:15	75,3	201,22	507	46
116	18.08.07	15:10	102,2	99,50	206	19
116	25.11.07	Vorprobe	0,0	-	< NWG	-
116	27.11.07	14:00	29,0	220,60	42	4
116	28.11.07	15:55	54,9	85,77	278	25
116	29.11.07	20:20	81,3	94,85	1053	95
116	30.11.07	15:10	100,2	108,83	5679	511
116	01.12.07	10:00	121,0	106,60	130	12

Tabelle 11-17: Übersicht zur fäkalen Eliminierung von Bismut als $\text{Bi}(\text{CH}_3)_3$

ID	Bismut-Dosis (mg)	Masse fäkal eliminierten $(\text{CH}_3)_3\text{Bi}$ (ng)	ppm fäkal eliminierten Bismuts	ppm der Bismut-Dosis
116	215	525	2,65	2,44
116	215	936	4,71	4,36
116	430	765	1,95	1,78

11.6 Messergebnisse der Untersuchungen humaner Hepatozyten

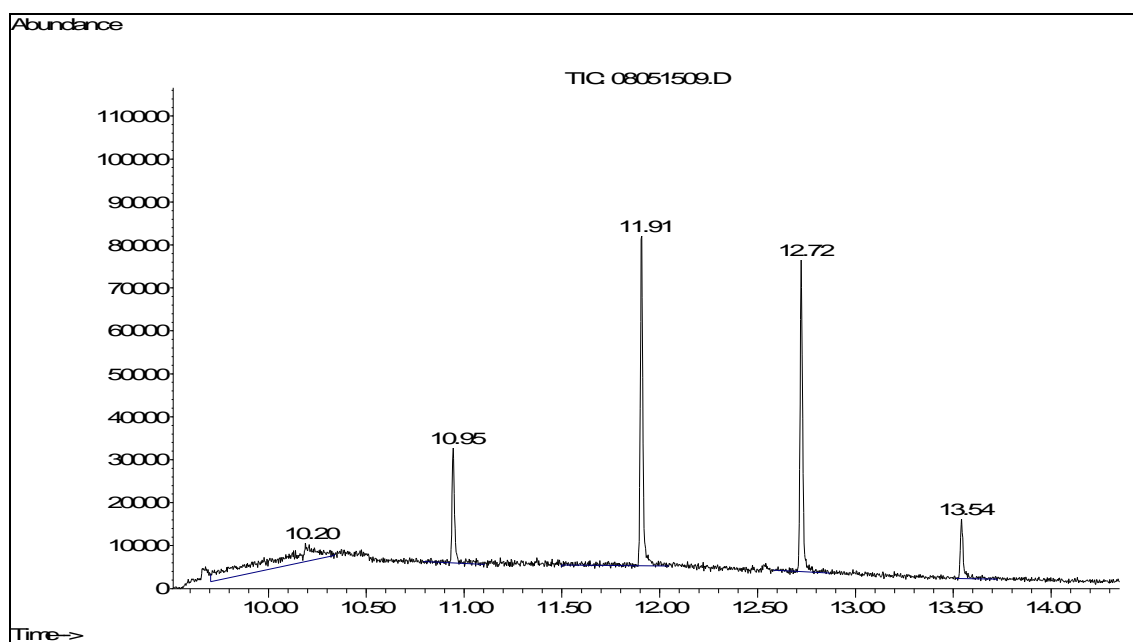


Abbildung 11-2: Chromatogramm des Blindwertes nach Ethylierung der Nährlösung mit Natriumtetraethylborat

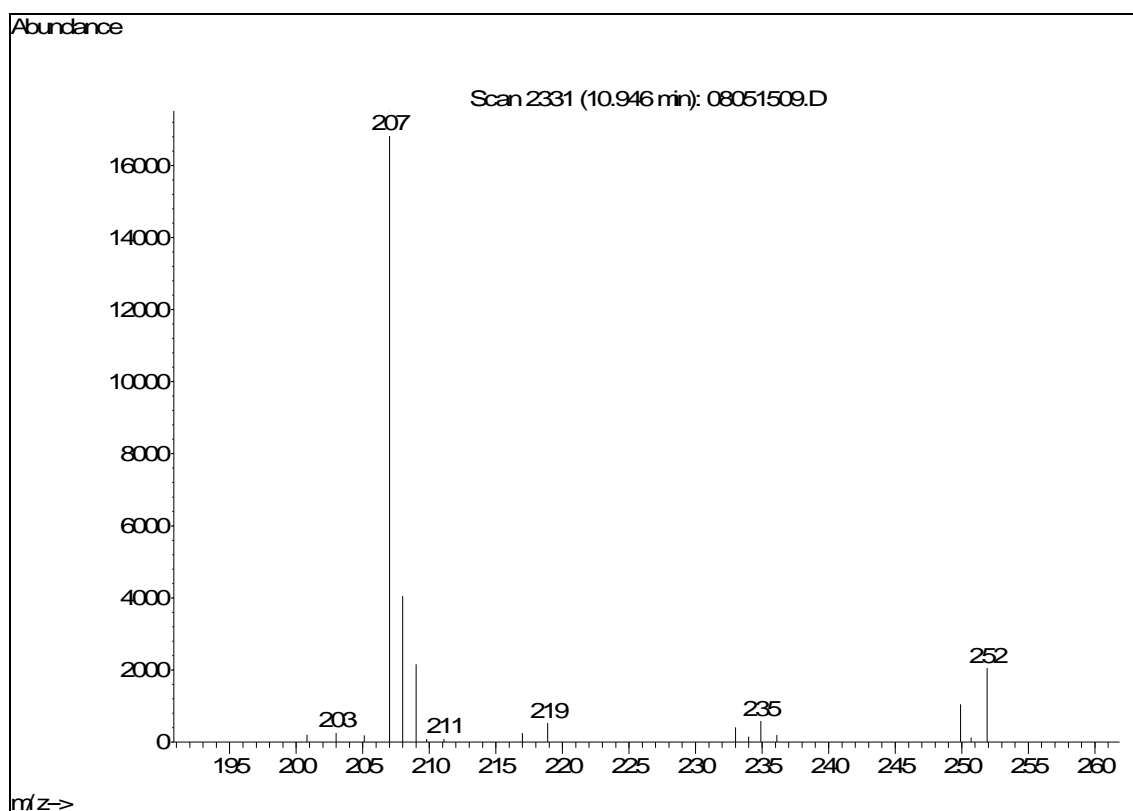


Abbildung 11-3: Massenspektrum von D3 mit der Retentionszeit von 10,95 min

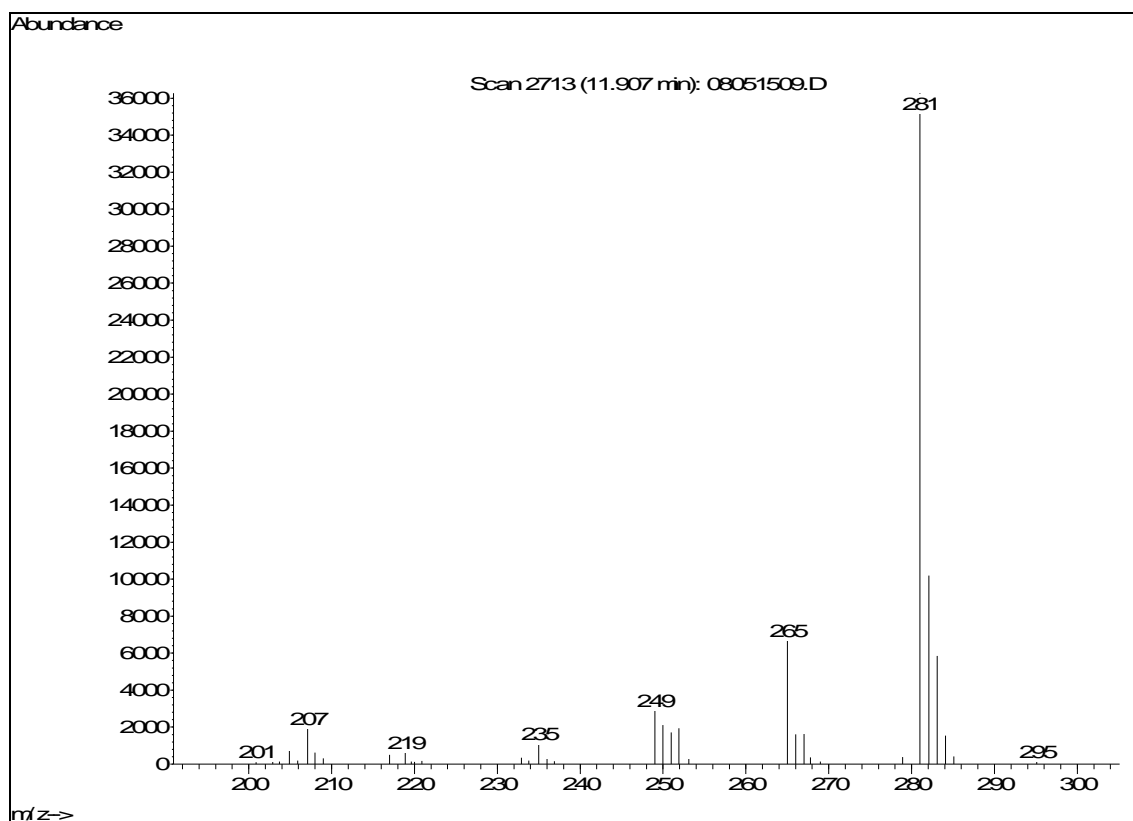


Abbildung 11-4: Massenspektrum von D4 mit der Retentionszeit von 11,91 min

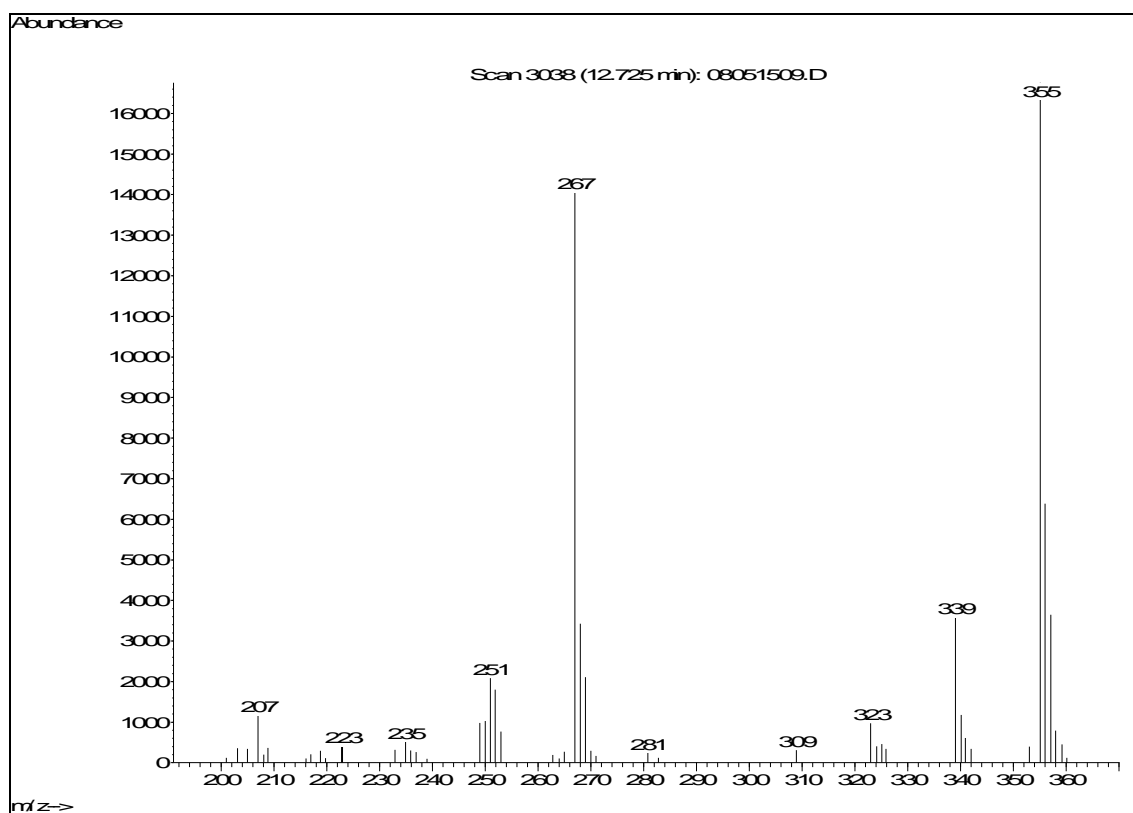


Abbildung 11-5: Massenspektrum von D5 mit der Retentionszeit von 12,72 min

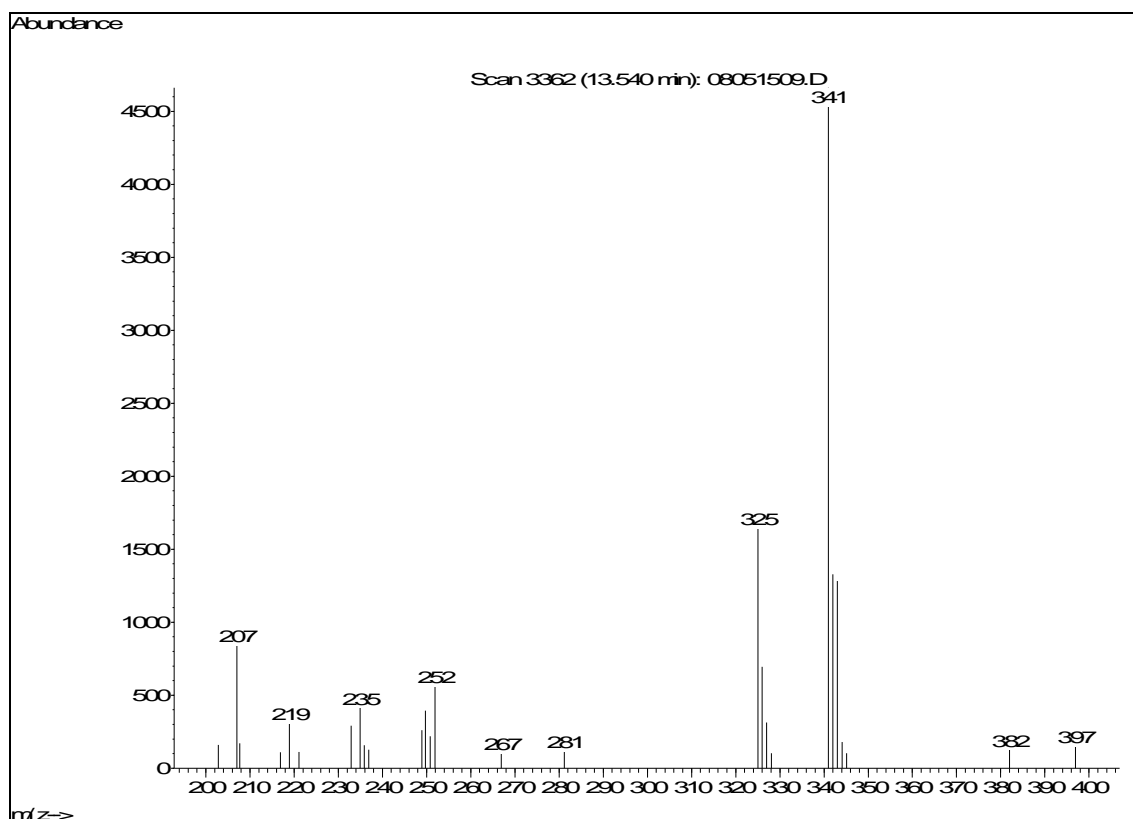


Abbildung 11-6: Massenspektrum von D6 mit der Retentionszeit von 13,54 min

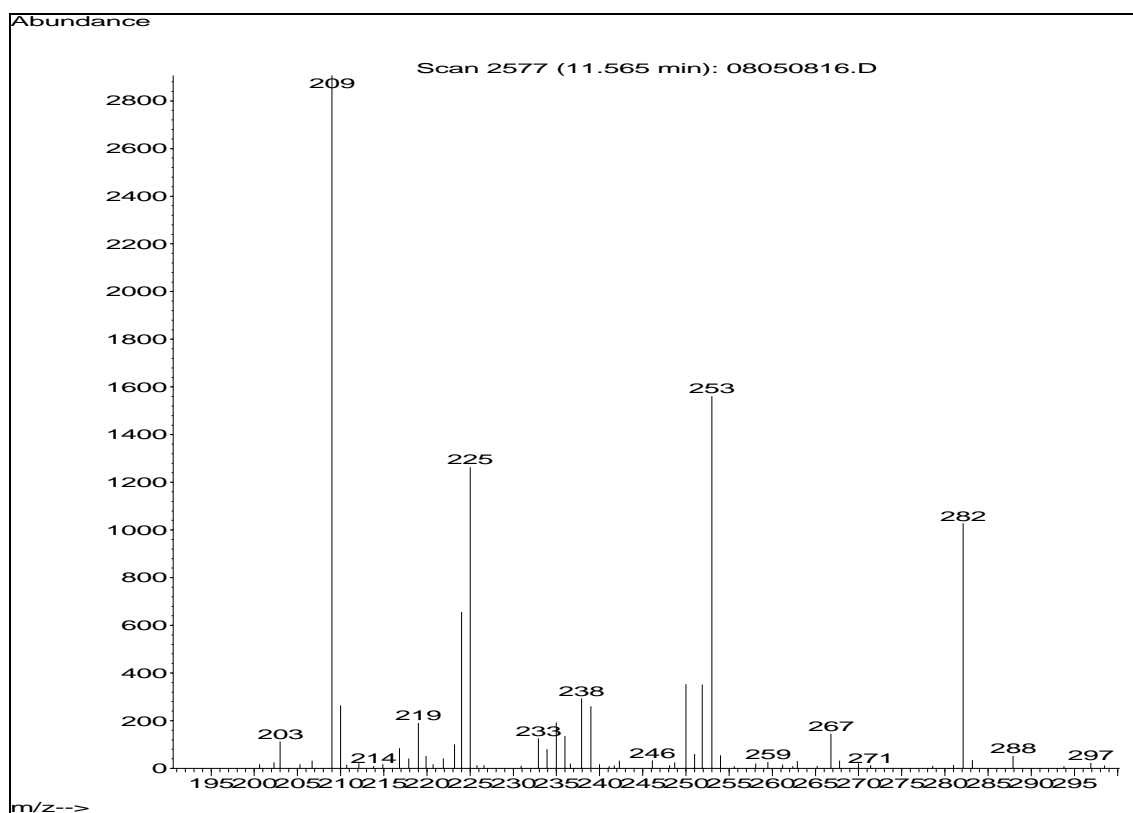


Abbildung 11-7: Massenspektrum von Monomethyldiethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutcystein und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat (m/z (EI-MS): 282 (M^+), 253 (M^+-29), 225 (M^+-57), 209 (M^+-73)).

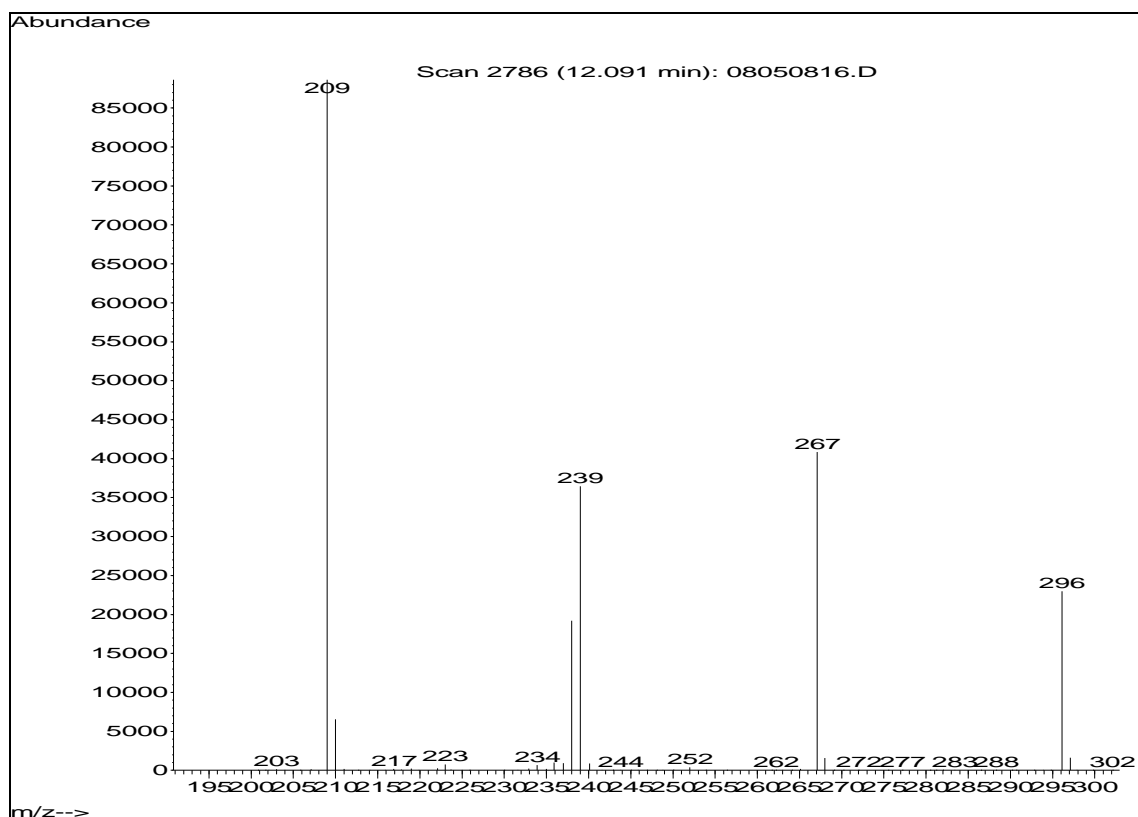


Abbildung 11-8: Massenspektrum von Triethylbismut nach 24-stündiger Inkubation von HepG2-Zellkulturen mit Bismutcystein und anschließender Ethylierung mit Natriumtetraethylborat (m/z (EI-MS): 296 (M^+), 267 (M^+-15), 239 (M^+-30), 209 (M^+-45)).

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Boertz
Vorname: Jens
Geburtsdatum: 29.05.1973
Geburtsort: Herten/Westfalen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1980-1983 Comenius Grundschule, Herten
1983-1985 Städtische Realschule, Herten
1985-1990 Private Bischöfliche Erich-Klausener-Ganztagsrealschule, Herten
Schulabschluss: Fachoberschulreife mit Qualifikation zur gymnasialen Oberstufe
1990-1991 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Recklinghausen
1991-1994 Hans-Böckler-Kollegsche, Marl
Schulabschluss: Staatlich geprüfter Chemisch-technischer Assistent (CTA)
Fachhochschulreife

Zivildienst

10/1994-12/1995 Sozialwerk St. Georg, Gelsenkirchen
Diakonisches Werk, Marl

Studium

10/1996 Studium der Chemie (DII) an der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen
08/1998 Vordiplom
12/2004 Diplom-Prüfungen
02-08/2005 Diplomarbeit am Institut für Umweltanalytik und Angewandte Geochemie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred V. Hirner.
Studienabschluss: Diplom-Chemiker
10/2005-06/2008 Anfertigung der vorliegenden Arbeit

Beruflicher Werdegang

08/2001-02/2003	SEWA GmbH & Co. KG, Sediment- und Wasseranalytik, Essen, Studentische Hilfskraft
03/2003-08/2005	Institut für Umweltanalytik und Angewandte Geochemie, Universität Duisburg-Essen, Studentische Hilfskraft
10/2005-09/2007	Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universitätsklinikum Essen, Wissenschaftlicher Mitarbeiter
10/2007-12/2007	Institut für Umweltanalytik und Angewandte Geochemie, Universität Duisburg-Essen, Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Fortbildungen

GDCh 379/06, High Resolution Biopolymer Mass Spectrometry
21.-25.08.2006, Konstanz

Proteomics Workshop, DFG Forschungszentrum für
experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg, 17.-
20.09.2006, Würzburg

Publikationsliste

Boertz J, Hartmann LM, Mosel F, Sulkowski M, Diaz-Bone R, Rettenmeier AW, Hirner AV (2008) Determination of trimethylbismuth in the human body following ingestion of bismuth subcitrate. *Drug Metabolism and Disposition, Submitted*

Michalke K, Schmidt A, Huber B, Meyer J, Sulkowski M, Hirner AV, **Boertz J**, Mosel F, Dammann P, Hilken G, Hedrich HJ, Dorsch M, Rettenmeier AW und Hensel R (2008) The role of intestinal microbiota in the transformation of bismuth and other metals and metalloids into volatile methyl and hydride derivatives in humans and mice. *Appl Environ Microbiol* **74**:3069-3075.

Bester K, Andresen JA, **Boertz J**, Hirner AV, Jamrozik M, Schlüsener M, Widmann R (2007) Bestimmung von Abbaubilanzen von Substanzen aus personal-care Produkten und Hormonen in Kläranlagen (BASPiK). Abschlussbericht.

Vorträge und Posterbeiträge

Vortrag

Untersuchungen zum Humanmetabolismus des Bismuts mittels massenspektrometrischer Kopplungsmethoden, GDCh Neujahrskolloquium, 06.02.2008, Universität Duisburg-Essen.

Posterbeiträge

Hippler J, Hollmann M, **Boertz J**, Hirner AV (2008) Synthesis, isolation, identification and derivatisation of monomethyl bismuth cysteine. 4th International Conference on Trace Element Speciation in Biomedical, Nutritional and Environmental Sciences, 25.-29.05.2008, München.

Boertz J, Bester K, Hirner AV (2007) Eliminierungsraten der cyclischen Siloxane Octamethylcyclotetrasiloxan (D4), Decamethylcyclopentasiloxan (D5) und Dodecamethylcyclohexasiloxan (D6) in Kläranlagen. Jahrestagung Umweltchemie und Ökotoxikologie, 26.-28.09.2007, Osnabrück.

Boertz J, Mosel F, Sulkowski M, Rettenmeier AW, Hirner AV (2007) Exhalation of trimethylbismuth after oral application of a bismuth salt – evidence for biomethylation of metals in the human body. TraceSpec2007, 04.-07.09.2007, Münster.

Mosel F, **Boertz J**, Michalke K, Sulkowski M, Hirner AV, Rettenmeier AW (2007) Exhalation von Trimethylbismut nach oraler Applikation eines Bismutsalzes – ein Hinweis auf die Biomethylierung von Metallen beim Menschen? DGAUM, 21.-24.03.2007, Mainz.

Boertz J, Mosel F, Hirner AV, Rettenmeier AW (2006) Exhalation von Trimethylbismut nach oraler Applikation eines Bismutsalzes - ein Hinweis auf die Biomethylierung von Metallen beim Menschen? Forschungstag des Universitätsklinikums Essen, 17.11.2006, Essen.

Mosel F, Goebell J, **Boertz J** (2006) Keimnachweis bei Patienten mit Harnwegsinfekten mit dem MALDI-TOF-Massenspektrometer, 3. Interdisziplinärer Workshop des Forum Proteomics, 30.06.-01.07.2006, Universitätskolleg Bommerholz

Boertz J, Bester K, Hirner AV (2005) Eliminierungsraten von cyclischen Siloxanen am Beispiel von Decamethylcyclopentasiloxan (D5), Bestimmung von Abbaubilanzen von Substanzen aus personal-care Produkten und Hormonen in Kläranlagen – Schlüsse für die Eliminierung von Problemsubstanzen. 18.10.2005, Essen.

Erklärungen

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Jens Boertz befürworte.

Essen,

Prof. Dr. Alfred V. Hirner

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich für die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen,

Jens Boertz

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen,

Jens Boertz

Danksagung

Bei den Herren Prof. Dr. Alfred V. Hirner und Prof. Albert W. Rettenmeier möchte ich mich nicht nur für die Unterstützung bei der Bearbeitung dieser interdisziplinären Thematik im Rahmen der Forschergruppe, sondern ebenfalls für wertvolle Ratschläge zur beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung bedanken.

Den Mitgliedern des Instituts für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen und des Instituts für Hygiene und Arbeitsmedizin des Universitätsklinikums Essen danke ich für die breite Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Probandenstudien und das harmonische Arbeitsklima.

Bei Frau PD Dr. Elke Dopp, Frau Gabriele Zimmer und Frau Ute Zimmermann aus der Arbeitsgruppe *In-vitro*- und Molekulare Toxikologie bedanke ich mich für die produktive Zusammenarbeit bei den Zellversuchen und das stets offene Gehör bei allgemeinen Fragestellungen.

Markus Hollmann und Jörg Hippler danke ich für die phantastische Zusammenarbeit bei vergangenen und aktuellen Bismut-Projekten.

Ein besonderer Dank gilt zudem Jörg Hippler, der aufgrund seines unermesslichen Erfahrungsschatzes immer wieder zur Lösung technischer Probleme beigetragen hat und weiterhin immer ein großes Reservoir Schokolade für lange Labornächte und -wochenenden versteckt hatte.

Meinen ehemaligen Bürokollegen Markus Hollmann, David Riesop und Sven Vedder danke ich für unterhaltsame Mittagspausen und die Aufmunterung in Motivationstälern.

Annette danke ich für den Antrieb in der letzten Phase dieser Arbeit und die Worte: „Schreib, schreib, schreib!“

Mein ganz besonderer Dank gilt aber meinem Schwager Thomas sowie meiner Schwester und Patentante Kim, die mich beide seit Jahren immer wieder gerne unterstützt haben.